RELAZIONE TECNICO-SCIENTIFICA FINALE

Titolo del Progetto	***Realizzazione di sistemi ad elevata automazione per il monitoraggio di malattie infettive mediante dosaggio di marcatori urinari.***
Acronimo	**URIMARK**

Presentato da (Capofila)	**DIESSE RICERCHE S.r.l.**
Partner	▪ DIESSE Ricerche S.r.l. (Partner 1 – Capofila) ▪ Università degli Studi di Siena (Partner 2) ▪ Università degli Studi di Firenze (Partner 3)
Materia	

Descrizione sintetica del progetto

Utilizzando tecnologie avanzate in termini di automazione da un lato e molecolari dall'altro vogliamo ottenere risposte di diagnostica urinaria più veloci e complete. Il campione biologico prelevato per indagini microbiologiche potrà essere sottoposto ad analisi aggiuntive per la caratterizzazione dei patogeni presenti. Questo rappresenta un importante valore aggiunto poiché in una stessa seduta analitica potrebbero emergere informazioni fino ad oggi non disponibili, consentendo una diagnosi innovativa e precoce (nelle urine, infatti, possono essere individuati marcatori di patologie non ancora riscontrabili a livello sierologico). La forte multidisciplinarità dei partners garantisce la sostenibilità tecnico-scientifica del progetto. La Diesse Ricerche Srl è una spin off dell'azienda Diesse Diagnostica Senese Spa che da 25 anni opera nella diagnostica delle malattie infettive, presente sul mercato mondiale con strumentazione e kit di propria progettazione e realizzazione, con competenze in chimica, immunologia, biologia molecolare, elettronica, robotica. L'Università di Siena si propone nell'individuazione, mediante piattaforme proteomiche, di marcatori di infezioni da vari agenti patogeni per i quali non sono disponibili test urinari. La tecnologia SELDI-ToF è un approccio innovativo

veloce e versatile per l'identificazione/misurazione di biomarcatori associati a patologie e consente l'analisi di molecole difficili da identificare con metodi classici. Tuttavia questa metodologia non è stata finora applicata alla ricerca di biomarcatori di infezione batterica nelle urine quando invece la caratterizzazione del repertorio proteico urinario è la base per la ricerca di marcatori da cui sviluppare nuovi sistemi diagnostici con sensibilità, specificità, semplicità di utilizzo e a basso costo. L'Università di Firenze si propone nella mappatura degli antigeni peptidici dei nuovi biomarcatori identificati con l'approccio proteomico, tramite la sintesi di una serie di peptidi che coprano le loro intere sequenze, al fine di sviluppare anticorpi altamente specifici per l'identificazione automatica dei biomarcatori stessi nell'urina.

1. VALUTAZIONE TECNICA IN ITINERE DEL PROGETTO (SCHEDA RIASSUNTIVA)

Parte I – <u>Stato di avanzamento del progetto</u>

1. Descrivere lo stato di avanzamento del progetto *(max 1500 caratteri).*

(OO1): Sviluppo e messa a punto di protocolli sperimentali per l'analisi SELDI-ToF/MS di campioni di urine da pazienti infettati da L. pneumophila ; selezione e validazione di potenziali biomarcatori proteici urinari; selezionati e validati dieci picchi proteici in grado di discriminate in modo statisticamente significativo i pazienti infettati da L. pneumophila dai controlli sani: sensibilità oltre il 95 % e specificità del 100 %.

Per ottenere reagenti immunologici è stata scelta la Chlamydia Trachomatis come agente infettivo patogeno ed è stata poi sintetizzata una libreria di peptidi per essere utilizzati nella immunizzazione di topi per ottenere anticorpi altamente selettivi.

(OO2): Realizzazione di kit diagnostici in piastra per: C. Albicans, S. Agalactiae, G. Vaginalis e C. Trachomatis.

(OO3) e (OO4): Realizzati due strumenti prototipo funzionanti (Preparatore e Analizzatore) con tutte le caratteristiche richieste.

(OO5): Iniziate prove studio e sviluppo di algoritmi di elaborazioni di immagine su colonie sviluppate a seguito di semina manuale e automatica ed ingegnerizzato nuovo strumento .

2. Dare indicazione della conformità temporale e tecnica dell'avanzamento del progetto in relazione alla proposta originale descrivendo gli eventi che hanno condizionato lo svolgimento dell'attività progettuale e motivandone l'eventuale non conformità a quanto prospettato in fase progettuale iniziale *(max 500 caratteri).*

OO1 (Attività): Conclusa

3 secondo cronoprogramma

4 anticipata al 10° mese

OO2 (Attività): Concluse

3 ritardata per difficoltà nel reperimento di campioni

5 e 6 secondo cronoprogramma

OO3 (Attività): Concluse

6 avviata in anticipo

OO4 (Attività): Concluse

6 avviata in anticipo

OO5 (Attività): Concluse

3. Dare indicazione della fattibilità degli obiettivi di progetto rimanenti. *(max 800 caratteri).*

In base ai risultati ottenuti nel corso del primo anno, la fattibilità di tutti e cinque gli obiettivi OO1, OO2, OO3, OO4, OO5, è stata confermata nei tempi previsti dal nuovo cronoprogramma .

Parte II – Analisi sulla possibilità del progetto di conseguire i risultati attesi

1. Descrivere i risultati del progetto raggiunti *(max 800 caratteri).*

*OO1: M*essa a punto una serie di metodologie, mediante la proteomica, per l'identificazione di biomarcatori relativi a patogeni del tratto urinario e non (es. Legionella). Realizzazione di librerie di peptidi per l'immunizzazione e l'ottenimento di

anticorpi da impiegare nello sviluppo di kit diagnostici. Attualmente disponibili librerie per *C. Trachomatis.*

*OO2: D*isponibili anticorpi per kit ELISA: C. Albicans, S. Agalactiae, G. Vaginalis e C. Trachomatis (sperimentazione interna in corso).

OO3: Realizzato un preparatore automatico (***Plus Finder ++ Preparator***) per la manipolazione dei campioni urinari per la fase analitica di screening.

OO4: Realizzato un analizzatore (***Plus Finder ++ Analayzer***) per lo screening rapido delle batteriurie.

OO5: Ingegnerizzato un seminatore automatico (***Plus Finder ++ Robobact***)

2. Dare indicazione delle criticità impreviste sorte durante la realizzazione del progetto, delle soluzioni strategiche individuate/applicate, del mantenimento del grado di innovatività del progetto, delle eventuali ricadute sul piano finanziario *(max 500 caratteri).*

OO1: Difficile reperimento campioni d'urina per patogeni rari (TBC). Ricerca di collaborazioni per studio specificità biomarcatori.

OO2: Difficile recupero di tamponi vaginali. Accordo con Centro Diagnostico Senese per reperimento.

OO3: Riprogettazione interna dei tappi di gomma delle provette per assenza in commercio.

OO4: Riprogettazione interna delle provette cambiando composizione (da metacrilato a polistirolo) per problemi di sterilizzazione.

OO5: Conclusa

3. Dare indicazione, alla data della valutazione in itinere, della capacità potenziale sussistente di creare prodotti, processi e servizi innovativi (messa a punto/uso di nuovi modelli/metodologie, risoluzione di problemi tecnologici/scientifici, ecc.) *(max 500 caratteri)*

OO1 e OO2: L'utilizzazione di queste tecnologie per la creazione e produzione di nuovi kit diagnostici è rimasta valida e inalterata.

OO3 e OO4: E' stato realizzato un prodotto vendibile ad alto contenuto tecnologico.

OO5: Rimasta inalterata la possibilità di usufruire un prodotto vendibile ad alto contenuto tecnologico.

4. Elencare eventuali pubblicazioni scientifiche o altre forme di divulgazione dei risultati, domande di brevetto presentate, network costituiti o ai quali il raggruppamento o i singoli partner si sono associati in funzione del progetto. *(max 500 caratteri)*

Parte dei risultati ottenuti sono stati divulgati attraverso la compilazione di tre Tesi di Laurea Specialistica in Ingegneria informatica presso L'università degli Studi di Siena.
Sempre presso la facoltà di Ingegneria sono stati tenuti due seminari nel corso di studio di Bioinformatica.
Il marketing di Diesse Diagnostica Senese Spa ha già prodotto un depliant pubblicitario per i due strumenti oggetto di OO3 e OO4.
Sono state depositate domande di brevetto in molti paesi al mondo.
Il sistema è stato presentato a mostre sia sul territorio nazionale che all'estero ,
Il progetto è stato anche premiato dalla Regione Toscana come 1 dei 7 progetti di eccellenza.

2. VALUTAZIONE DELLE ATTIVITÀ SVOLTE DAL PARTENARIATO BENEFICIARIO

Alla luce dell'esperienza maturata dal gruppo di lavoro nello sviluppo del progetto, indicare:
1. Il contributo fornito dal Capofila in relazione agli obiettivi della proposta *(max 800 caratteri).* Il capofila è il coordinatore ed il responsabile di tutte le attività di rendicontazione e gestione del progetto, come da ATS sottoscritta. Al fine del raggiungimento degli obiettivi previsti, il capofila coordina gli interventi dei partner di ricerca finalizzati al risultato, in quanto unico presente in tutti i cinque obiettivi operativi. Il capofila fornisce al partenariato input mirati alla ricerca, finalizzata alla produzione aziendale e alla gestione protetta della proprietà intellettuale al fine della realizzazione di strumenti diagnostici.
2. Il contributo fornito da ciascun Partner del progetto in relazione agli obiettivi della proposta *(max 800 caratteri).* Il partner 2 è coinvolto nell' OO1 e sta mettendo a disposizione le proprie competenze nel settore della biologia molecolare e della proteomica per la caratterizzazione dei nuovi biomarcatori di agenti infettivi. Il partner 3 anch'esso coinvolto nell'OO1 collabora per la maturata esperienza nella individuazione e successiva sintesi di peptidi utilizzabili per metodiche di immunizzazione.
3. L'impatto della proposta sulle nuove assunzioni di personale di RS&I: - nuovi addetti alla ricerca e sviluppo (n°6), di cui donne (n°5); - laureati competenti formati (n°7), di cui donne (n°6); - scienziati in fase di training (n°2), di cui donne (n°1); - personale con maggiore qualificazione (n°7), di cui donne (n°6).

Commento. *(max 500 caratteri)*

I risultati del primo anno mostrano un'inaspettata capacità produttiva tecnico-scientifica con la conclusione di quasi due strumenti su tre previsti.

La collaborazione tra Capofila e Partners è soddisfacente con scambio di informazioni intenso e proficuo a 360°.

La realizzazione di due strumenti ha portato alla crescita numerica del personale scientifico dedicato al progetto. E' stato istituito un laboratorio di ricerca e sviluppo meccanico.

3. VALUTAZIONE DI CONGRUITÀ DELLE SPESE E DEL LORO AVANZAMENTO IN RELAZIONE ALLO STATO DI AVANZAMENTO DEL PROGETTO

Ai fini della valutazione di congruità delle spese e del loro avanzamento, indicare i costi sostenuti e quelli effettivamente inseriti nella piattaforma Artea per la rendicontazione ed esporre un commento in relazione allo stato di avanzamento del progetto:

	Costi richiesti dal progetto	Costi sostenuti	Documenti di spesa inseriti nella piattaforma ARTEA per la rendicontazione [€]
Spese di personale	€ 2.278,020,00	€ 2.472.074,97	Tutti i giustificativi richiesti sono stati inseriti nella piattaforma ARTEA
Costi degli strumenti e delle attrezzature nella misura e per il periodo in cui sono utilizzati per il progetto di ricerca (acquisto prodotti ad alta tecnologia)	€ 0,00	€ 0,00	
Costi dei fabbricati e dei terreni	€ 0,00	€ 0,00	
Costi della ricerca contrattuale, delle competenze tecniche e dei brevetti, acquisiti o ottenuti in licenza da fonti esterne a prezzi di mercato; i costi dei servizi di consulenza e di servizi equivalenti utilizzati esclusivamente ai fini dell'attività di ricerca;	€ 162.000,00	€ 175.106,01	Tutti i giustificativi richiesti sono stati inseriti nella piattaforma ARTEA
Spese generali supplementari derivanti direttamente dal progetto di ricerca	€ 626.000,00	€ 693.530,44	Tutti i giustificativi richiesti sono stati inseriti nella piattaforma ARTEA
Eventuali altri costi di esercizio	€ 350.068,00	€ 385.956,77	Tutti i giustificativi richiesti sono stati inseriti nella piattaforma

			ARTEA
TOTALE	€ 3.416.088,00	€ 3.726.668,19	

Commento: I costi sostenuti rispecchiano un avanzamento del progetto considerando che il 100% delle spese ammissibili è stato raggiunto nel secondo periodo del progetto.

4. OBIETTIVI OPERATIVI E RISULTATI OTTENUTI

Elencare gli obiettivi operativi e per ciascuno di essi, rispetto al periodo di riferimento, compilare una tabella come quella sotto riportata fornendo le informazioni richieste (*).

Obiettivo operativo 1
Ricerca e sviluppo di reagenti immunologici per l'identificazione veloce di germi presenti in campioni biologici urine/tamponi (vaginali).
Attività realizzate
Illustrare le attività realizzate specificando il ruolo di ciascun partner del progetto. **ATTIVITA' 1: Identificazione e validazione di biomarcatori urinari proteici e peptidici mediante tecnologia proteomica (UniSi)** L'attività propone l'individuazione, mediante analisi di spettrometria di massa SELDI-ToF, di marcatori proteici di infezioni da vari agenti patogeni per i quali non è attualmente disponibile un test diagnostico per le urine. La relazione che segue è un sunto della ricerca svolta fino ad oggi, ed articolata nelle seguenti fasi: [a] Come primo obbiettivo, ci siamo posti di valutare l'applicabilità della tecnologia SELDI-ToF/MS alla ricerca di biomarcatori proteici di infezione batterica nelle urine. A tale scopo abbiamo utilizzato urine di pazienti affetti da *Legionella pneumophila* di serotipo 1 come golden standard di riferimento per verificare l'impostazione e le condizioni operative dello strumento SELDI-ToF nella ricerca di tali marcatori. I campioni utilizzati in questa prima fase sono: -urine di pazienti con legionellosi, a differenti stadi di positività e/o quadro clinico, positive per l'antigene urinario di *L. pneumophila*. -urina negativa di donatore sano, negative per l'antigene urinario di *L. pneumophila*. Dal punto di vista sperimentale abbiamo seguito il protocollo di preparazione del campione raccomandato dal produttore. Abbiamo scelto ProteinChip con tre diverse superfici

cromatografiche (CM10: scambio cationico; Q10: scambio anionico; IMAC30-Cu^{2+}: interazione proteine-cationi metallici). L'acquisizione degli spettri di massa: è stata fatta utilizzando 4 protocolli diversi (differenziati per la focus mass e laser energy), in modo da determinare preferenzialmente specie proteiche a basso (LMW-FM:10000 Da, LE: 2000 nJ), medio (MMW_I-FM:20000 Da, LE: 2500 nJ; MMW_II-FM:35000 Da, LE: 3000 nJ) ed alto peso molecolare (HMW-FM:55000 Da, LE: 3500 nJ) e ripetendo ogni protocollo su ciascuna superficie.

Da queste analisi preliminari abbiamo selezionato i Proteinchip più adatti per il nostro tipo di studio e cioè i CM10 e IMAC30-Cu^{2+}, poiché il maggior numero di differenze qualitative è stato riscontrato con questi due tipi di selettori.

[b] Abbiamo applicato le condizioni sperimentali messe a punto nella prima fase dell'attività ad un più ampio numero di campioni di urine positive per l'infezione da *L. pneumophila,* allo scopo di individuare e selezionare un gruppo di picchi proteici in grado di differenziare la urine da pazienti affetti da L. pneumophila dalle urine dei relativi controlli sani.

In totale abbiamo analizzato 28 campioni così suddivisi:

-14 campioni positivi (cioè urine raccolte da pazienti infettati da *L. pneumophila* e sottoposte a analisi sierologica per confermare a valutare il grado di positività all'infezione).

-14 controlli negativi (cioè urine raccolte da volontari sani che non presentavano al momento del campionamento alcuna alterazione clinica; tali urine sono state comunque testate per via sierologica per confermare la loro negatività all'infezione da *L. pneumophila*).

Dopo l'acquisizione, gli spettri sono stati processati e confrontati, inoltre i dati sperimentali sono stati valutati utilizzando parametri statistici uni-variati quali il *p*-value (bassi valori di *p* indicano la presenza di differenze significative di espressione tra i gruppi analizzati) e la curva ROC (indica la capacità discriminante di un potenziale biomarcatore, tanto più questo valore si avvicina ad 1, maggiore è tale capacità).

Nella tabella sottostante sono riportati i picchi di interesse suddivisi in base al diverso protocollo di acquisizione ed identificati con il valore *m/z*:

Protocollo di acquisizione	m/z ±SD	Intensità±SD		*P*-value	ROC
		positivi	negativi		
CM10 10k	4351.281±9.258	11.525±10.146	4.535±5.076	0.006	0.704
	13437.167±32.925	7.905±14.326	0.766±0.741	>0.0001	0.820
CM10 20k	11746.706±37.788	84.264±91.506	4.462±4.505	>0.0001	0.925
	11902.289±52.053	20.170±32.313	2.946±3.134	>0.0001	0.812
CM10 35k	11661.800±69.008	187.325±130.538	85.735±22.652	0.003	0.714
	20990.494±24.925	27.080±25.797	1.138±0.656	>0.0001	0.883
CM10 55k	21031.677±32.578	44.276±43.183	3.285±3.425	>0.0001	0.837
	33596.241±362.719	13.148±6.450	4.209±1.684	>0.0001	0.917
	34896.776±185.704	10.024±4.097	2.875±2.488	>0.0001	0.933
IMAC30 10k	5878.663±5.481	19.372±21.754	1.139±2.432	>0.0001	0.812
	10689.534±8.355	12.459±12.293	0.291±0.455	>0.0001	0.943
	11751.713±4.493	72.111±79.979	2.808±3.070	>0.0001	0.863
IMAC30 20k	11795.644±16.734	135.514±131.415	9.566±10.191	>0.0001	0.863
	11961.409±12.486	34.264±31.289	3.061±2.722	>0.0001	0.853
IMAC30 35k	11684.085±30.185	358.178±254.787	107.057±36.468	>0.0001	0.827

Tabella 1: potenziali biomarcatori proteici urinari di infezione da *L. pneumophila*.

Tali picchi rappresentano il gruppo di potenziali biomarcatori proteici urinari di infezione da *L. pneumophila*, da sottoporre a validazione valutandone sia la specificità che la sensibilità.

[c] Durante la fase abbiamo iniziato la validazione dei picchi selezionati durante la fase precedente, saggiando la validità di tale marcatore contro una popolazione di campioni più ampia e più eterogenea al fine di restringere il numero dei picchi e portare avanti solo quelli con il maggior valore predittivo, più robusti.

Abbiamo ampliato la casistica a nostra disposizione analizzando fino ad oggi un totale di 22 campioni di urine da pazienti infettati da *L. pneumophila* ed altrettanti campioni di urine da pazienti sani utilizzate come controllo. Inoltre abbiamo analizzato 6 campioni di urine da

pazienti positivi all'infezione da *Mycobactrerium tubercolosis* (TBC) al fine di definire quali tra i picchi da noi selezionati fossero presenti in maniera esclusiva nelle urine positive alla L. pneumophila e quindi reali potenziali biomarcatori di tale infezione oppure se la loro presenza fosse una semplice conseguenza di una generica infezione batterica a carico del sistema respiratorio. L'analisi degli spettri di massa ottenuti, e suddivisi secondo il protocollo di acquisizione, ha portato ai seguenti risultati:

-CM10 10k: i picchi a 4351.281 m/z, e a 13437.167 m/z, sono stati confermati e validati come *L. pneumophila* specifici.

-CM10 20k: solo il picco a 11746.706 m/z è stato confermato come *L. pneumophila* specifico.

-CM10 35k: entrambi i picchi precedentemente selezionati, rispettivamente a 11661.800 e 20990.494 m/z, con questo protocollo sono stati confermati come *L. pneumophila* specifici.

-CM10 55k: dei tre i picchi precedentemente selezionati, quello 21031.677 m/z è stato confermato come *L. pneumophila* specifico. Gli altri due picchi, rispettivamente a 33596.241 m/z e 34896.776 m/z, sono risultati essere marcatori aspecifici di infezione batterica, in quanto rivelati anche nei campioni di urine positive per il *M. tubercolosis*.

-IMAC30 10k: tutti e tre i picchi precedentemente selezionati, rispettivamente a 5878.663 m/z, 10689.534 m/z e 11751.713 m/z, sono stati confermati come *L. pneumophila* specifici.

-IMAC30 20k: sono stati confermati i picchi a 11795.644 m/z e 11961.409 m/z, e sono risultati essere specifici per *L. pneumophila.*

-IMAC30 35k: questo protocollo ha portato alla validazione del spicco a 11684.085 m/z specifico per *L. pneumophila*.

Per ciascuno dei picchi selezionati sono stati aggiornati i parametri statistici normalmente utilizzati per valutare la capacità diagnostica di un potenziale biomarcatore: il *p*-value e la curva ROC.

Un'attenta analisi dei grafici relativi alla distribuzione delle intensità di segnale di ciascun picco conferma il fatto che nessuno dei biomarcatori da noi selezionati riesce da solo a discriminare la totalità dei campioni di urina L. pneumophila positivi da quelli di urina da pazienti positivi all'infezione da *Mycobactrerium tubercolosis*, e da quelli di urina dei controlli sani negativi.

Abbiamo deciso quindi di studiare i picchi da noi selezionati applicando tecniche di analisi statistica multivariata come la Principal Component Analysis (PCA), per determinare se l'uso

combinato di tutti i picchi o parte di essi riesca a segregare i tre gruppi in maniera soddisfacente.

Sono stati analizzati numerosi set di dati, originati da combinazioni diverse dei dati relativi alle intensità di due o più picchi selezionati con entrambe le superfici utilizzate (CM10 e IMAC30 Cu^{2+}). Tre set di dati hanno prodotto i migliori risultati ed i grafici relativi sono riportati in figura 1. Il primo set (figura 1 A) è composto da quattro picchi (4351.281, 13437.167, 11746.706 e 20990.494 m/z) precedentemente selezionati con il ProteinChip CM10. Il secondo set (figura 1 B) è composto da tre picchi (5878.663, 10689.534 e 11795.644 m/z) precedentemente selezionati con il ProteinChip IMAC30 Cu^{2+}. Il terzo set (figura 1 C) analizzato è invece il risultato della combinazione dei due precedenti set.

Dall'osservazione dei grafici riportati in figura 1, possiamo osservare che il primo ed il secondo set di dati sono riusciti riescono a classificare in maniera univoca il 75 % e l'86,5 % dei campioni analizzati come positivi all'infezione da *L. pneumophila*. Come da aspettative, i risultati migliori sono stati ottenuti analizzando il terzo set di dati, in questo caso l'uso simultaneo e combinato dei sette picchi ci ha permesso di classificare in maniera selettiva il 95,5 % dei campioni di urine diagnosticate come positive all'infezione da *L. pneumophila* ed il 100% delle urine negative.

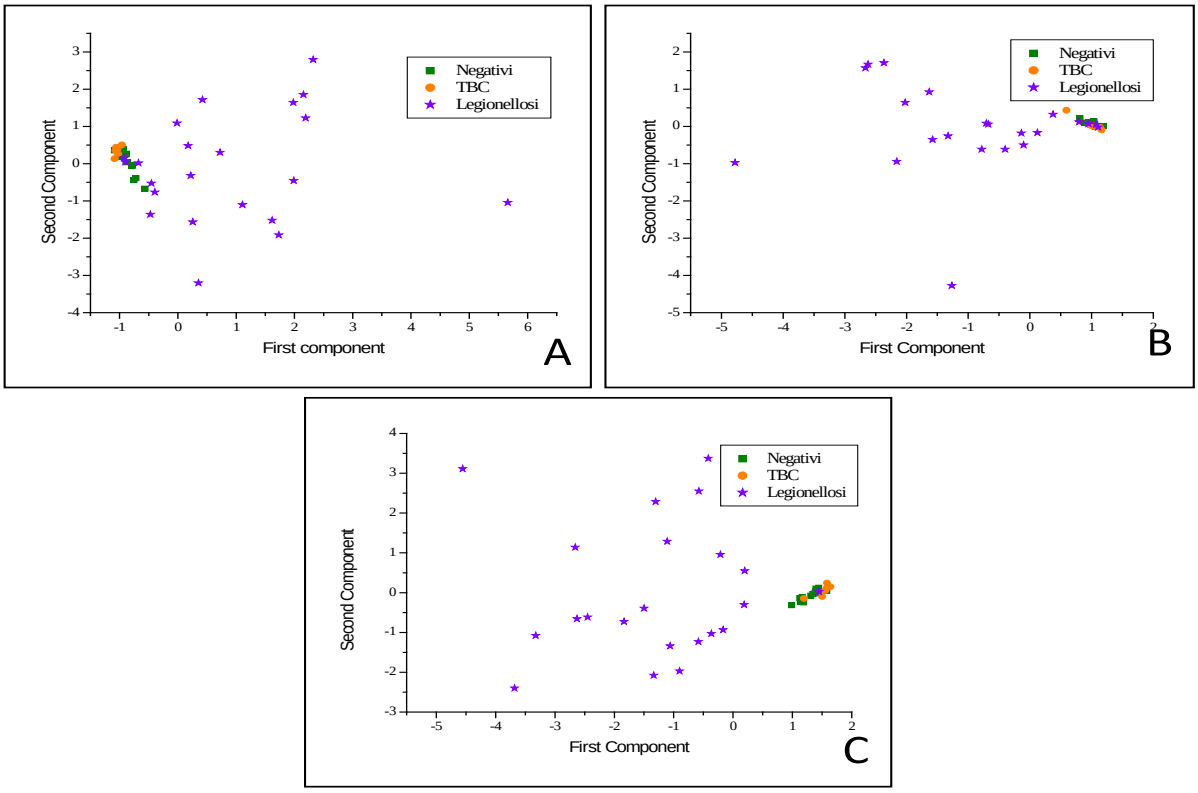


Figura 1. Grafici relativi all'analisi PCA di tre set di dati analizzati.

Risultati raggiunti (Descrivere i risultati raggiunti e i punti cardine (*milestones*) di sviluppo nell'attuazione delle attività. Descrivere in maniera puntuale le eventuali difformità fra i risultati attesi e i risultati conseguiti scientificamente e tecnicamente e proporre le conseguenti azioni correttive.)

-Sviluppo e massa a punto di protocolli sperimentali per l'analisi SELDI-ToF/MS di campioni di urine da pazienti infettati da *L. pneumophila,* ma estendibile anche ad altri tipi di infezioni batteriche, per le selezione e validazione di potenziali biomarcatori proteici urinari.
-Selezione e validazione di dieci picchi proteici in grado di discriminate in modo statisticamente significativo i pazienti infettati da *L. pneumophila* dai controlli sani.
-Sette picchi proteici sono stati parzialmente validati come biomarcatori urinari dell'infezione da *L. pneumophila*. Tali picchi vanno a costituire una "signature" proteica in grado di discriminare tra pazienti infettati e non, con sensibilità oltre il 95 % e specificità del 100 %.
-Utilizzando le urine TBC positive come gruppo di controllo, ci ha permesso di scartare 2 dei 10 potenziali biomarcatori in quanto sono risultati essere a comune tra le due infezioni. Tuttavia, l'analisi comparativa non ha portato alla luce nessun picco proteico presente esclusivamente nelle urine TBC e quindi nessun potenziale marcatore specifico per l'infezione da *Mycobactrerium tubercolosis*.
Successivamente alla fase di validazione dei potenziali biomarcatori, selezionati tramite spettrometria di massa SELDI-ToF (relazione intermedia), abbiamo deciso di applicare altre tecniche proteomiche come l'elettroforesi bidimensionale computerizzata, così da poter sfruttare la complementarità dei due approcci.

In breve, i campioni sono stati preparati come descritto di seguito:

Circa 8.5 mL del pool di urine positive sono stati concentrati (Vivaspin cut-off 3 kDa) fino ad 1 mL e arricchiti nel loro contenuto proteico con ProteoMiner (BIORAD). La stessa procedura è stata applicata al pool di campioni di urine negative. I campioni così ottenuti sono stati risolti tramite elettroforesi bidimensionale. Le mappe proteomiche sono state ottenute utilizzando per la focalizzazione isoelettrica (I dimensione) un gradiente di pH non-lineare coprente un intervallo da 3 a 10, e per la SDS-PAGE (II dimensione) un gradiente lineare di acrilamide che permette di separare proteine il cui peso molecolare è compreso in un intervallo di 8-200 kDa. I gel colorati con argento nitrato sono stati sottoposti a scansione mediante densitometria laser.

In figura 1 e 2 sono riportate le immagini digitalizzate delle mappe proteomiche relative, rispettivamente, al Pool di urine Positive e al Pool di urine Negative.

Figura 1: mappa proteomica colorata con argento nitrato ottenuta con il pool di Urine Positive

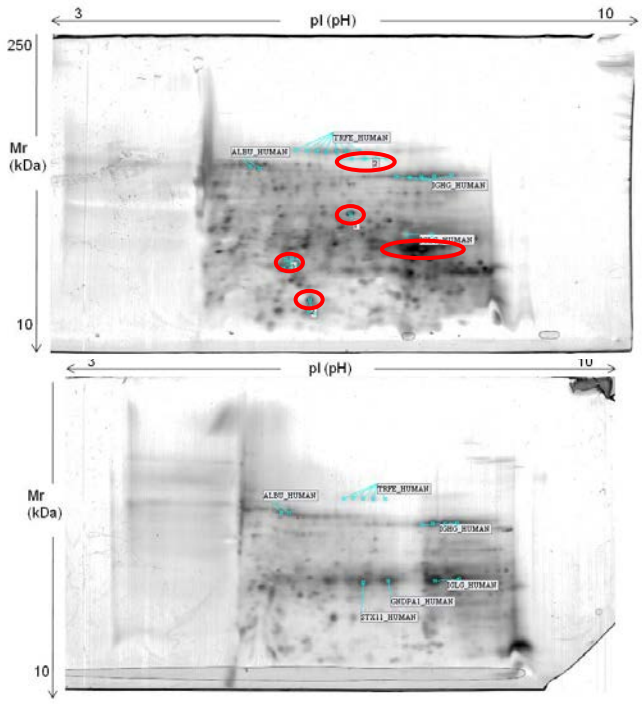


Figura 2: mappa proteomica colorata con argento nitrato ottenuta con il pool di Urine Negative

Su tali immagini digitalizzate è stata condotta un'analisi quali/quantitativa per mezzo di un software dedicato.

I risultati ottenuti dall'analisi d'immagine ci permettono di trarre le seguenti conclusioni:

- I pattern proteici dei due pool analizzati differiscono notevolmente sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo. In particolare, il pool delle urine positive presenta un contenuto proteico maggiore sia a livello quantitativo (contenuto proteico totale) che qualitativo (numero di specie proteiche all'interno del pool). Questi risultati confermano quanto già osservato nelle analisi precedenti, condotte per mezzo di una diversa tecnologia (SELDI-ToF/MS) utilizzando singolarmente i campioni di urine positive e

negative.

- Gli spot che rappresentano le differenze qualitative più marcate tra i due campioni in esame (cerchiati in rosso in Figura 1) hanno valori di peso molecolare del tutto congruenti con quelli dei potenziali biomarcatori di infezione da *Legionella* da noi selezionati e validati per mezzo dell'analisi SELDI-ToF/MS.

ATTIVITA' 2: Mappatura degli antigeni peptidici dei biomarcatori proteici identificati (UniFi)

Basandosi sull'esperienza acquisita negli anni dall'Università di Firenze è stato effettuato uno studio sistematico per l'identificazione di proteine e di sequenze che siano altamente specifiche per il riconoscimento anticorpale.

L'identificazione e di epitopi (ovvero i siti di legame per gli anticorpi presenti sulle proteine) può essere utile sia nella ricerca e nello sviluppo di nuovi farmaci o vaccini, sia nel campo della diagnostica. Un metodo efficace per la caratterizzazione di epitopi è basato sulla scansione di peptidi sintetici (metodica chiamata "*pepscan analysis*"). Questa tecnica utilizza una libreria di sequenze peptidiche costituita da segmenti sovrapposti della proteina target per saggiare la loro capacità di legare gli anticorpi di interesse tramite opportune metodiche, ad es. saggi immunoezimatici su piastra (ELISA). Il metodo è rapido, piuttosto economico e particolarmente adatto per l'identificazione di epitopi riconosciuti su una particolare proteina bersaglio da parte di diversi anticorpi. In questo modo è inoltre possibile effettuare la mappatura di epitopi conformazionali, combinando sequenze peptidiche non adiacenti presenti in zone differenti della proteina bersaglio ed imponendo la rigidità conformazionale sulla struttura così ottenuta (peptidi vincolati conformazionalmente).

Lo studio della sequenza è la prima tappa fondamentale per l'identificazione di epitopi che possono essere selettivamente riconosciuti da anticorpi. In questa prima fase è stata studiata come target primario la *Chlamydia Trachomatis*, batterio patogeno per l'uomo. Al fine di produrre anticorpi selettivi per questa specie, rispetto alle altre forme di *Chlamydia*, sono state selezionate le proteine di interesse e all'interno di esse sono state identificate delle sequenze peptidiche contenenti i putativi antigeni.

Per l'identificazione di sequenze peptidiche contenenti epitopi sono stati inizialmente applicati metodi di calcolo che permettono di identificare porzioni della proteina che possono contenere

i siti di legame degli anticorpi, tramite opportuni algoritmi predittivi. Inoltre è stata disegnata e sintetizzata una libreria di peptidi di sovrapposti, basati sul IV dominio variabile della proteina di membrana MOMP, che rappresenta una delle principali proteine della C*hlamydia*. È stata infine sintetizzata una libreria di peptidi da essere utilizzati per immunizzazione di topi così da ottenere anticorpi altamente selettivi per i diversi serotipi di *Chlamydia Trachomatis*.

In questa fase di lavoro abbiamo testato l'immunoreattività di quattro anticorpi prodotti da DIESSE per mezzo di Western Blotting (WB) monodimensionale (SDS-PAGE) utilizzando come antigene il contenuto proteico di urine di pazienti affetti da legionellosi.

L'analisi WB si basa sulla specificità della reazione antigene-anticorpo e consente di identificare antigeni specifici in una miscela complessa di proteine. Questo tipo di analisi permette di selezionare l'anticorpo in grado di riconoscere gli antigeni batterici presenti nelle urine dei pazienti, caratteristica essenziale per lo sviluppo di dispositivi diagnostici che utilizzano le urine come campioni da analizzare. I risultati ottenuti da questo tipo di analisi dovranno essere tuttavia integrati e confrontati con i dati provenienti dall'analisi SELDI-Tof, allo scopo di ricercare la coppia/le coppie di antigene urinario/anticorpo che mostrano le migliori performance diagnostiche.

Circa 8.5 mL del pool di urine positive sono stati concentrati (Vivaspin cut-off 3 kDa) fino ad 1 mL e arricchiti nel loro contenuto proteico con ProteoMiner (BIORAD). Quindi, 20 microgrammi/lane di campione sono stati risolti tramite SDS-PAGE e successivamente elettrotrasferiti su membrana di nitrocellulosa.

Quattro repliche identiche dalla stessa membrana sono state sottoposte al seguente protocollo sperimentale:

I. Saturazione delle membrane di nitrocellulosa.

II. Incubazione delle membrane con anticorpi primari.

A questo scopo, sono stati utilizzati quattro diversi anticorpi primari prodotti da DIESSE immunizzando dei topi con antigeni diversi di *Legionella pneumophila:*

1_LEG 33B-43

2_Pab *L. pneumophila* 19K

3_LEG 33B-2

4_LEG 132B-75

III. Incubazione delle membrane con anticorpo secondario

Le membrane sono state incubate con una soluzione di Anti IgG Mouse-Peroxidase Conjugate (un anticorpo in grado di riconoscere e legarsi selettivamente agli anticorpi primari).

IV. Rivelazione delle bande immunoreattive mediante chemioluminescenza (metodo ECL)

In figura 3 è riportata l'immagine digitalizzata della lastra immunoreattiva. In rosso sono messe in evidenza le bande immunoreattive, ciascuna corrispondente ad un diverso antigene proteico, contenuto nelle urine di pazienti affetti da legionellosi, riconosciuto da ciascun siero.

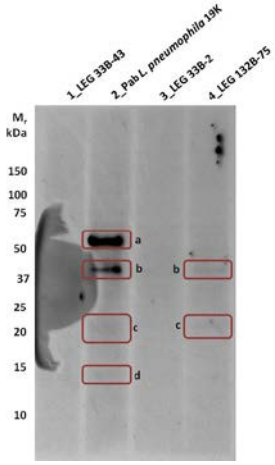


Figura 3: Analisi dell'immunoreattività dei quattro anticorpi prodotti da DIESSE per mezzo di Western Blotting (WB) monodimensionale (SDS-PAGE) utilizzando come antigene il contenuto proteico di urine di pazienti affetti da legionellosi. In rosso sono evidenziate le bande immunoreattive, ciascuna corrispondente ad un diverso antigene proteico, contenuto nelle urine di pazienti affetti da legionellosi, riconosciuto da ciascun siero

L'analisi qualitativa delle bande immunoreattive presenti sulla lastra ha permesso di evidenziare il pattern di immunoriconoscimento di ciascun anticorpo nei confronti della sorgente antigenica utilizzata, nel nostro caso le proteine contenute nelle urine di pazienti affetti da legionellosi.

I risultati da noi prodotti mostrano che:

-L'anticorpo **LEG 33B-43** non riconosce nessun antigene all'interno della sorgente antigenica

da noi utilizzata, come messo in evidenza dall'assenza di bande nella lastra.

-L'anticorpo **Pab *L. pneumophila* 19K** possiede il pattern immunoreattivo più ricco, formato da 4 bande (antigeni proteici) ai seguenti valori peso molecolare: banda "**a**"~55 kDa, banda "**b**" ~40kDa, banda "**c**" ~20 kDa, banda "**d**" ~13 kDa.

-L'anticorpo **LEG 33B-2** non riconosce nessun antigene.

-L'anticorpo **LEG 132B-75** possiede un pattern immunoreattivo costituito da 2 bande: "**b**" ~40kDa e "**c**" ~20 kDa, entrambe riconosciute anche dall'anticorpo **Pab *L. pneumophila* 19K.**

Successivamente abbiamo analizzato mediante SDS-PAGE e WB altri campioni di urine e anticorpi. Questi campioni erano stati precedentemente analizzati dai ricercatori della DIESSE-Ricerche per indagare un problema di sensibilità/specificità di un kit ELISA in fase di sviluppo per la diagnosi dell'infezione da *Legionella pneumophila* nelle urine di pazienti. Il nostro compito è stato quello di ripetere gli esperimenti utilizzando sistemi di rivelazione più sensibili a nostra disposizione, quali la colorazione argentica ("Silver Staining") e la rivelazione mediante ECL per l'analisi WB.

Il campione proteico utilizzato come antigene è stato preparato presso i laboratori di ricerca della DIESSE nel seguente modo: un pool di urine positive al test per l'infezione da Legionella (composto da urine risultate positive sia al kit diagnostico in fase di sviluppo, che ad un kit diagnostico commerciale utilizzato come test di riferimento) è stato elettroeluito mediante Mini Prep Cel. Le 10 frazioni ottenute (campioni A-L) sono state concentrate (tramite sistema Centricon) e separate in SDS-PAGE utilizzando gel precast Criterion-XT 12%. Dopo SDS-PAGE , il gel è stato sottoposto a colorazione argentica "Silver Staining" (figura 4) oppure elettrotrasferito su membrana di nitrocellulosa e successivamente testate in WB.

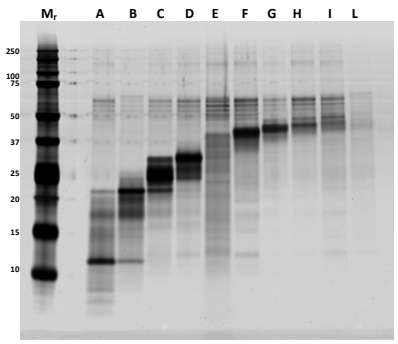


Figura 4. Immagine digitalizzata del gel monodimensionale delle frazioni

(A-L) di urina positiva dopo colorazione argentica

Quattro repliche identiche dalla stessa membrane sono state sottoposte al seguente protocollo sperimentale:

I. Saturazione della membrana di nitrocellulosa.

II. Incubazione delle membrane con anticorpi primari.

Le membrane saturate sono state incubate con 4 diversi anticorpi primari prodotti da DIESSE:

1_PAB "Urina positiva", anticorpo policlonale prodotto immunizzando i topi con urina positiva secondo sia il kit commerciale che il sistema in fase di sviluppo.

2_PAB "Urina falsa negativa", anticorpo policlonale prodotto immunizzando i topi con urina positiva secondo il kit commerciale, ma non riconosciuta come tale dal sistema in fase di sviluppo.

3_ PAB "Urina negativa", anticorpo policlonale prodotto immunizzando i topi con urina negativa.

4_ LEG 33B-2,

III. Incubazione delle membrane con anticorpo secondario

Le membrane sono state incubate con una soluzione di Anti IgG Mouse-Peroxidase Conjugate (un anticorpo in grado di riconoscere e legarsi selettivamente agli anticorpi primari).

IV. Rivelazione degli spot immunoreattivi mediante chemioluminescenza (metodo ECL)

Nelle figure 5-8 sono riportate le immagini digitalizzate delle lastre immunoreattive.

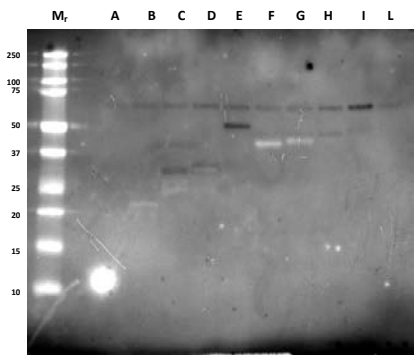


*Figura 5: Western Blot ottenuto con**PAB “Urina positiva”***

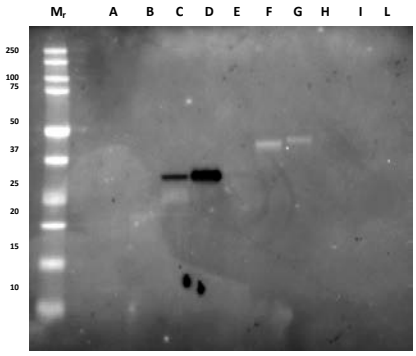


*Figura 6: Western Blot ottenuto con **PAB “Urina falsa negativa”***

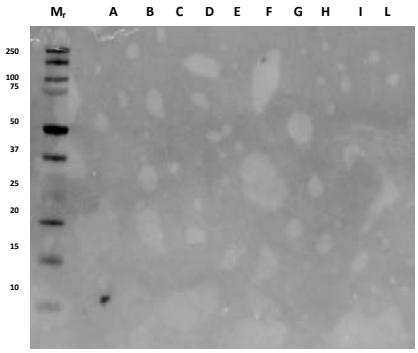


*Figura 7: Western Blot ottenuto con **PAB “Urina negativa”***

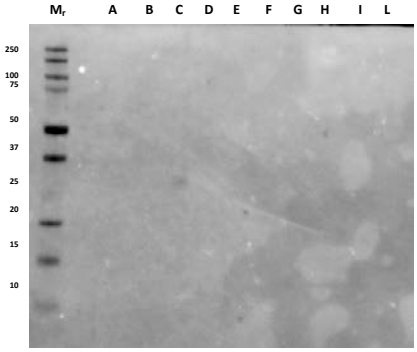


*Figura 8: Western Blot ottenuto con **LEG 33B-2***

L’analisi qualitativa delle bande immunoreattive presenti sulle lastre, cioè il pattern di immunoriconoscimento di ciascun anticorpo nei confronti della sorgente antigenica utilizzata, ha prodotti i risultati riassunti in tabella 1.

Tabella 1. Analisi qualitativa dei pattern di immunoriconoscimento. La presenza di bande immunoreattive nei blot analizzati è riportata come valori di M_r (Da).

	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**L**
PAB “Urina positiva”	64.797	64.797 21.201	64.181 29.658 24.527	64.181 32.564	62.222 50.326	62.818 40.995	63.571 42.324	62.222 45.654	63.571 48.825	63.419

PAB "Urina falsa negativa"	----	21.201	29.658 24.527	32.564	----	40.995	42.324	45.654	----	----
PAB "Urina negativa"	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
LEG 33B-2	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

L'anticorpo **PAB "Urina positiva"** riconosce una banda a circa 64.000 Da in tutte le frazioni analizzate. Inoltre, lo stesso anticorpo riconosce bande a vari pesi molecolari in quasi tutte le frazioni di urina, tranne che nella prima e nell'ultima lane (frazioni A, L).

L'anticorpo **PAB "Urina falsa negativa"** ha un pattern antigenico parzialmente sovrapponibile all'anticorpo precedente, sebbene manchi in tutte le frazioni la banda a 64.000 Da; nelle frazioni A, E, I ed L mancano bande immunoreattive.

Gli anticorpi **PAB "Urina negativa"** e **LEG 33B-2** non riconoscono nessun antigene.

Per definire meglio le differenze tra **Urina Positiva** ed **Urina Falsa Negativa** abbiamo deciso di analizzare il profilo proteico totale ottenuto mediante spettrometria di massa SELDI alla ricerca di differenze che potessero giustificare il diverso comportamento dei due gruppi nei saggi ELISA. Per questo confronto abbiamo utilizzato il campione 2869b (**Urina Positiva**) ed il campione 14660 (**Urina Falsa Negativa**)**.**

L'analisi comparativa degli spettri SELDI-ToF ottenuti utilizzando ProteinChip IMAC30-Cu^{2+} non ha evidenziato alcuna differenza significativa nel profilo proteico dei due campioni.

Alcune differenze quali/quantitative sono invece emerse dal confronto degli spettri SELDI-ToF ottenuti utilizzando ProteinChip CM10 (scambio cationico). In figura 9 sono poste a confronto tre diverse regioni di *m/z* degli spettri SELDI-ToF ottenuti.

Figura 9. Analisi degli spettri SELDI-ToF. I rettangoli colorati evidenziano i profili proteici diversi in specifiche regioni m/z.

ATTIVITA' 3: Utilizzo dei peptidi sintetici per produzione di anticorpi monoclonali al alta affinità per lo sviluppo di kit diagnostici ad elevata specificità (UniFi e Diesse Ricerche)

Nel corso dell'attività 2 sono stati mappati epitopi peptidici della proteina MOMP di *Chlamydia Trachomatis*. In particolare, utilizzando il *software* ProtScale abbiamo individuato delle sequenze peptidiche a carattere idrofilo che, nella struttura della proteina, protrudono verso l'ambiente esterno e quindi potrebbero avere proprietà antigeniche ed essere riconosciute da anticorpi. Tali sequenze sono IVSLQLNKMKSRKSCGI (FG2), conservata in tutti i serotipi di *C. Trachomatis* analizzati, ARENPAYGRHMQDA (FG3A) e ARPNPAYGKHMQDA (FG3B), parzialmente conservate. Inoltre, abbiamo considerato il peptide ATTVFDVTTLDPTIAG (FG1), appartenente al dominio IV della proteina MOMP e già descritto in letteratura come

immunogeno.

I peptidi sopra descritti sono stati sintetizzati utilizzando una strategia di sintesi peptidica in fase solida (SPPS - *Solid Phase Peptide Synthesis*), purificati per estrazione in fase solida (SPE) e successiva cromatografia HPLC in fase inversa e caratterizzati analiticamente tramite HPLC analitica accoppiata a spettrometria di massa.

I peptidi così ottenuti sono stati utilizzati in saggi ELISA competitivi e indiretti…

Successivamente sono stati sintetizzati ulteriori tre peptidi sintetici, corrispondenti alle sequenze FG1, FG3A e FG3B sopra riportate, con l'aggiunta di un residuo di cisteina in posizione N-terminale, allo scopo di produrre coniugati con opportune proteine *carrier* da utilizzare come immunogeni per l'ottenimento di anticorpi monoclonali. Il peptide FG2 contiene un residuo di Cys nella sequenza nativa e quindi non è stato necessario modificarlo. Le proteine *carrier* prescelte sono la *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH) e l'Albumina del Siero Bovino (BSA); i relativi coniugati sono stati utilizzati per le immunizzazioni e per lo *screening* dei sieri immuni, rispettivamente. Per le coniugazioni si è utilizzato il protocollo basato su maleimmide, in modo da legare specificamente la funzione tiolica dei residui di cisteina dei peptidi con i gruppi amminici in catena laterale di residui di lisina sulle proteine *carrier*. Tutti i coniugati sono stati purificati per *gel filtration* e caratterizzati per HPLC-MS.

Il laboratorio Toscana Biomarkers ha fornito 4 peptidi corrispondenti a sequenze appartenenti al dominio IV della proteina di membrana immunodominante (MOMP) ciascuno coniugato con KLH. Per ciascuno dei peptidi coniugati, sono stati seguiti due protocolli di immunizzazione su gruppi di topi Balb/c femmine , il primo con iniezioni i.p. dell'antigene ed utilizzazione della milza come organo fornitore di plasmacellule,il secondo con immunizzazioni mirate al prelievo dei linfonodi poplitei .
Lo screening sierologico, fatto sui peptidi coniugati con BSA ha dato esito positivo rendendo le cellule estratte da milza o linfonodi materiale idoneo alla tecnica di fusione cellulare per la selezione di anticorpi monoclonali specifici..

ATTIVITA' 4: Immobilizzazione dei peptidi sintetici su chip per lo sviluppo di nuovi sistemi diagnostici ad elevata specificità e sensibilità (UnSi UniFI e Diesse Ricerche)

Anche questa attività dovrà svolgersi nel secondo anno, sulla base dei risultati ottenuti dall'attività 2, ma si è ritenuto opportuno svolgere un'attività preliminare, valutando le modalità di immobilizzazione covalente di opportune proteine modello e dei rispettivi anticorpi monoclonali su chip del biosensore ottico BiaCore, che permette di verificare facilmente l'efficacia dell'immobilizzazione con misure dirette di interazione antigene-anticorpo. In tale contesto, tre diversi anticorpi monoclonali specifici per proteine antigeniche (di interesse in quanto metaboliti urinari) sono stati immobilizzati per cattura ad alta affinità sulla superficie del chip del biosensore ed opportuni campioni sono stati utilizzati per verificare l'efficacia del legame

Su tre canali della superficie di un chip CM5 costituito da una matrice di destrano carbossimetilato, sono stati covalentemente immobilizzati, tramite *amine coupling*, tre diversi anticorpi monoclonali: (17-19) e (16-5) e, diretti contro la proteina K19, e 33B-2 diretto contro LPS. La formazione del legame ammidico tra un gruppo amminico primario degli anticorpi e un gruppo carbossilico della superficie del chip è stata ottenuta attivando la superficie con due iniezioni di EDC 0.4M / NHS 0.1M (50:50), iniettando gli anticorpi [5µg/ml] nel miglior buffer precedentemente selezionato e bloccando i siti liberi sulla superficie del chip con etanolammina 1M a pH 8.5. Per ogni anticorpo è stato raggiunto un sufficiente e comparabile livello di immobilizzazione (6100-6700 RU) ideale per eseguire studi di binding con lo stesso campione che passa contemporaneamente sui tre ligandi immobilizzati. Il canale 1 è stato utilizzato come riferimento ed è quindi stato attivato con EDC/NHS e bloccato con etanolammina; tutti i segnali registrati durante le analisi sono stati ottenuti come differenza tra il valore ottenuto sui canali attivi meno quello ottenuto sul canale di riferimento.

La funzionalità del chip è stata testata iniettando su tutti i canali la proteina 19K a varie concentrazioni (500, 250, 125, 62.5 µg/ml) in Running Buffer (0.1M HEPES, 1.5M NaCl, 30mM EDTA, 0.5% v/v p20). Come riportato in figura x, il segnale massimo di binding registrato al termine dell'iniezione è risultato proporzionale alla concentrazione di proteina iniettata sui due canali contenenti gli anticorpi anti 19K, ma è stato osservato un binding inaspettato anche sul canale contenente l'anticorpo anti LPS.

La prova di funzionalità del chip è proseguita iniettando un campione di LPS che è risultato poco solubile nel Running Buffer richiesto per gli studi Biacore ed è stato quindi testato alle

diluizioni di 1:500.000 e 1:250.000; nessun segnale di interazione è stato ottenuto con questo campione.

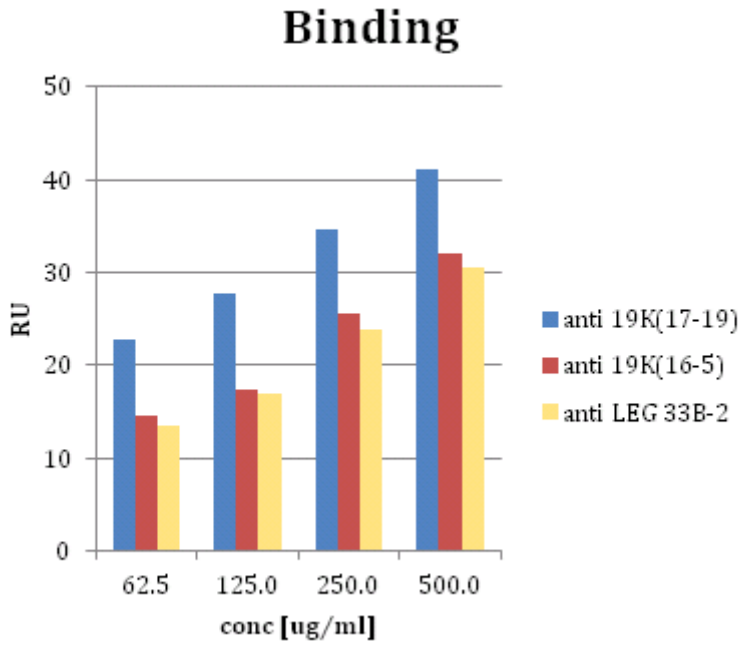


Figura x: valori di binding espressi in Unità di Risonanza (RU),

riferiti all'interazione tra la proteina 19K e i tre anticorpi immobilizzati.

Sono stati successivamente effettuati studi di binding con 10 campioni di urine già classificate come positive/negative, allo scopo di capire se la positività dei campioni fosse dovuta alla presenza di uno o più metaboliti derivanti dalla proteina 19K o da LPS. Gli studi sono stati condotti diluendo i campioni in Running Buffer 1:25 e rigenerando ogni volta la superficie del chip con iniezioni di tamponi a pH opposto.

In generale i segnali registrati sui 2 anticorpi anti 19K sono risultati più alti; tuttavia per ogni campione è stato osservato un segnale dovuto anche all'interazione con l'anticorpo anti LPS (figura xx), di conseguenza non è stato possibile stabilire quale fosse l'analita d'interesse presente nel campione biologico. Inoltre solo due urine classificate come negative (SC01 e TZ02) e una come positiva (6603) hanno dato risultati in accordo con la classificazione fornita.

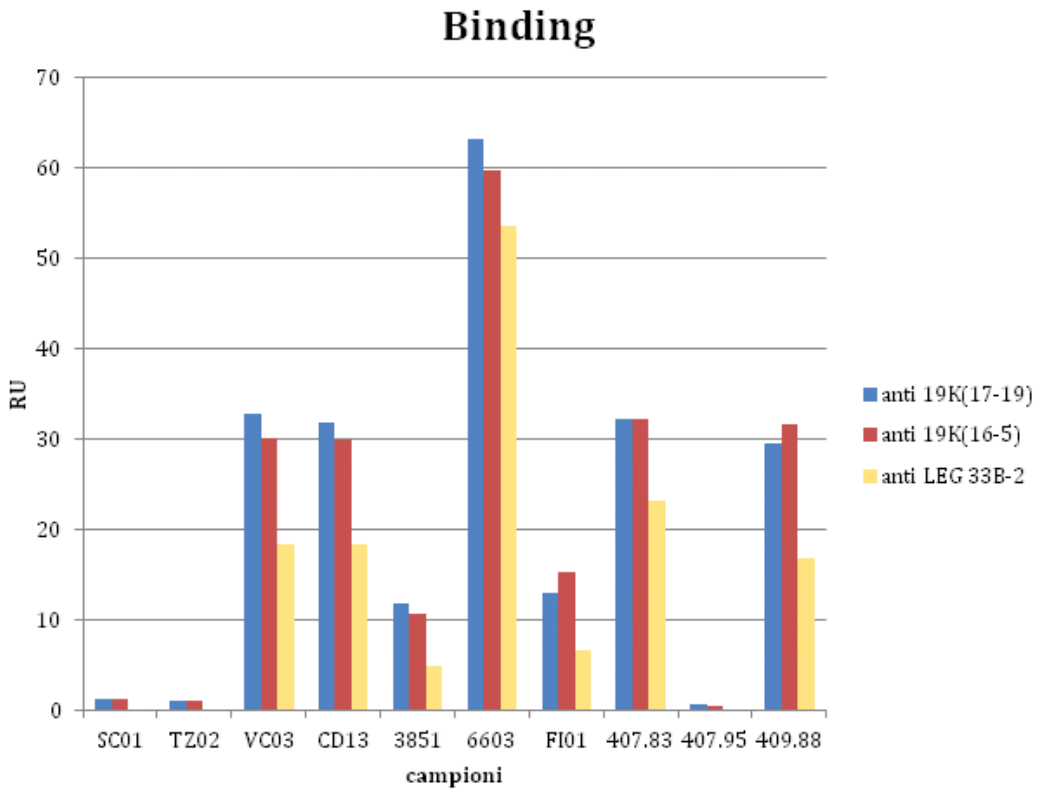


Figura xx: valori di binding espressi in Unità di Risonanza (RU), riferiti all'interazione tra 10 campioni di urina e tre anticorpi immobilizzati.

Per stabilire se la mancata sinificatività dei risultati ottenuti possa dipendere da un orientamento non ottimale degli anticorpi sul chip è stato deciso di utilizzare gli stessi anticorpi coniugati con biotina in modo da sfruttare l'interazione con la streptavidina già presente su appositi chip e da ottenere un orientamento univoco e teoricamente ottimale della porzione variabile di ogni anticorpo. A tal fine su tre canali della superficie di un chip rivestito di streptavidina sono stati immobilizzati gli anticorpi per cattura ad alta affinità attivando la superficie con NaOH 50mM, NaCl 1M e iniettando gli anticorpi a concentrazione 5 ug/ml in Running Buffer. Il livello di immobilizzazione è risultato paragonabile per gli anticorpi anti 19K (circa 3700 RU), e inferiore per l'anticorpo anti LPS (circa 2200RU). La funzionalità del chip è stata testata iniettando diverse concentrazioni della proteina 19K (5, 10, 20, 40 ug/ml), le risposte sono sempre state valutate come differenza tra il segnale registrato sui canali attivi e quello ottenuto sul canale di riferimento in cui è stato immobilizzato per cattura ad alta affinità

un anticorpo non legato al progetto (anti TG). I valori di binding sono risultati proporzionali alla concentrazione di proteina testata solo sul canale contenente l'anticorpo anti 19K(17-19); nel caso del canale contenente l'anticorpo anti 19K(16-5) i segnali sono risultati più bassi con differenze non significative tra le diverse concentrazioni, con l'anticorpo anti LPS non è stata rivelata alcuna interazione.

Per gli studi di binding, i 10 campioni di urina sono stati dializzati utilizzando il kit commerciale Sigma PUR-A-LYZER con taglio da 3500 Da, in modo da rimuovere i sali contenuti nei campioni che potrebbero interferire con la matrice del chip. Le urine sono state successivamente diluite 5 volte in Running Buffer e iniettate sul chip. I segnali ottenuti sono risultati bassi sugli anticorpi anti 19K e assenti sull'anticorpo anti LPS. I risultati ottenuti sono non riproducibili e poco significativi, non è quindi possibile distinguere tra urine negative e urine positive. Per verificare che non ci siano state perdite degli analiti durante il processo di trattamento del campione e che non ci siano problemi dovuti alla composizione fisiologica del campione di urina, sono state eseguite prove di dialisi di concentrazioni note di proteina 19K e sono state aggiunte le stesse quantità note di proteina a un campione di urina negativa dializzata. Da queste prove è emerso che il processo di dialisi provoca una perdita non significativa di proteina e che la stessa proteina, all'interno di un campione di urina dializzata, fornisce segnali che sono circa la metà rispetto a quando è diluita in Running Buffer.

Per tentare di rivelare l'interazione tra LPS e rispettivo anticorpo, il campione di LPS è stato concentrato per centrifugazione con filtri da 3000 Da, risospeso in PBS o in Running Buffer e iniettato sul chip a varie diluizioni, ma in nessun caso sono stati registrati segnali strumentali.

Strumenti/attrezzature

Indicare quali sono stati gli strumenti e le attrezzature utilizzati per la realizzazione delle attività.

Strumenti e attrezzature sono già disponibili presso i partecipanti e comprendono:

- Piattaforma Proteomica (già in possesso del partecipante UniSi), composta da: Spettrometro di Massa SELDI-ToF; equipaggiamento completo per l'Elettroforesi Bidimensionale computerizzata; MALDI-ToF - Calligrapher, spottatore automatico (già in possesso del partecipante UniSi)

- Strumenti di analisi statistica e bioinformatica.
- Sintetizzatore di peptidi automatico multiplo ed apparecchio per la sintesi peptidica mediata da microonde (per le sequenze difficili), disponibili presso UniFi.
- Sistemi automatici di flash chromatography, HPLC semipreparativi e sistemi cromatografici UPLC-MS per la purificazione e caratterizzazione analitica dei peptidi sintetici, disponibili presso UniFi

Sintetizzatore di peptidi automatico multiplo ed apparecchio per la sintesi peptidica mediata da microonde (per le sequenze difficili), disponibili presso UniFi.

- Sistemi automatici di flash chromatography, HPLC semipreparativi e sistemi cromatografici UPLC-MS per la purificazione e caratterizzazione analitica dei peptidi sintetici, disponibili presso UniFi.

- Biosensore ottico BIACORE T100 basato sul fenomeno della Risonanza Plasmonica di Superficie (SPR), per la rivelazione dell' interazione tra un ligando immobilizzato e un analita in soluzione, disponibile presso UniFi.

Risorse umane

Indicare la percentuale di utilizzo delle risorse umane rispetto a quanto previsto.

PARTNER 1

Dirigenti: 100%

Ricercatore: 100%

Personale Tecnico Qualificato: 100%

Co.Co.Pro (*come da variante approvata 23 /05/2012): 100%

PARTNER 2

Dirigenti:100%

Personale Amministrativo:100%

Tecnici laureati:100%

Assegnisti Collaboratori: 100%

PARTNER 3

Dirigenti: 100%

Assegnisti Collaboratori: 100%

Subcontratti

Non necessari

Risultati raggiunti

Descrivere i risultati raggiunti e i punti cardine (*milestones*) di sviluppo nell'attuazione delle attività. Descrivere in maniera puntuale le eventuali difformità fra i risultati attesi e i risultati conseguiti scientificamente e tecnicamente e proporre le conseguenti azioni correttive.

I risultati raggiunti per questo obiettivo operativo sono tutti quelli precedentemente indicati come attesi, ovvero:

1) Verifica e messa a punto dei protocolli sperimentali per l'applicazione della tecnologia SELDI-ToF/MS alla ricerca di biomarcatori proteici di infezioni batteriche nelle urine a partire dal "golden standard" (Legionella pneumophila).
Da questo punto di vista il sistema è perfettamente coincidente con i risultati attesi.

2) Scoperta, validazione e identificazione di nuovi marcatori urinari per la diagnosi dell'infezione da Legionella pneumophila per l'implementazione dei kit diagnostici già presenti sul mercato.
Da questo punto di vista il sistema è perfettamente coincidente con i risultati attesi.

3) Scoperta, validazione e identificazione di marcatori proteici per altre infezioni batteriche (es.: Streptococcus Pneumoniae; Mycoplasma spp.; Chlamydia spp.; Mycobacterium Tuberculosis) nelle urine di pazienti. Sono iniziati degli studi preliminari su Mycobacterium Tubercolosis che hanno evidenziato una differenza tra alcuni biomarcatori di L. pneumophila, ma, che al contrario, non fanno dei rimanenti degli specifici per TBC.

4) Mappa epitopica peptidica delle proteine individuate e identificazione di antigeni peptidici.
Completamente realizzata per *Chlamydia Trachomatis.*

5) Produzione di immunogeni peptidici e di anticorpi monoclonali diretti contro essi.
In corso di sviluppo.

6) Produzione di un sistema diagnostico per infezioni batteriche di tipo “spot-test”/peptide-protein array. Nell’ambito di ogni singolo biomarcatore e seguendo protocolli appropriati all’immunogeno, ciascun coniugato peptide–carrier verrà utilizzato per immunizzare gruppi individuali di topi Balb/c per la ricerca e selezione di anticorpi monoclonali specifici, utilizzando la tecnica degli ibridomi e/o per la produzione di anticorpi policlonali ottenuti con la tecnica del fluido ascitico.

Previsto nel secondo anno di attività (13-24 mesi)

1. **Identificazione e validazione di biomarcatori urinari proteici e peptidici mediante tecnologia proteomica.**

-Caratterizzazione del contenuto proteico urinario mediante una tecnica proteomica alternativa e complementare a quelle adottate nelle fasi precedenti (l’elettroforesi bidimensionale), e conferma dei risultati ottenuti tramite spettrometria di massa.

2. **Caratterizzazione biochimica di anticorpi anti-Legionella pneumophila mono e policlonali (UniSi)**

-Caratterizzazione immunologica di quattro anticorpi specifici per *Legionella pneumophila,* tra questi due hanno dimostrato di possedere immunoreattività specifica nei confronti delle urine raccolte da pazienti infettati e quindi potenzialmente utilizzabili in kit diagnostici: **PAB *L. pneumophila* 19K** e **LEG 132B-75**.

-Valutazione della diversa risposta di alcuni campioni di urine raccolti da pazienti affetti da legionellosi e testati con due diversi kit diagnostici: uno commerciale ed uno in fase di sviluppo. In particolare, è stato possibile ricondurre il problema del riconoscimento come negativi di campioni invece positivi da parte del kit in fase di sviluppo al diverso corredo antigenico posseduto dei campioni di urina e alla mancanza di selettori specifici per ciascuna differenza.

4. **Utilizzo di peptidi sintetici per screening di anticorpi in campioni di urina siero e produzione di anticorpi monoclonali ad alta affinità per lo sviluppo dei kit diagnostici ad elevata specificità**

- Ottenimento di quattro peptidi sintetici, individuati come possibili epitopi della proteine MOMP di Chlamydia Trachomatis.

- Ottenimento di coniugati dei peptidi di cui sopra, modificati con cisteina e legati tramite maleimmide a proteine carrier (KLH e BSA) per ottenere immunogeni.

5. Immobilizzazione di antigeni e anticorpi su chip di un biosensore ottico per lo sviluppo di nuovi sistemi diagnostici ad elevata specificità e sensibilità

- Ottenimento di un chip per biosensore ottico BiaCore portante tre diversi anticorpi monoclonali (anti-proteina K19 e anti-LPS) e valutazione delle sue prestazioni per il riconoscimento di antigeni in campioni di urina.

Costi sostenuti

Indicare i costi sostenuti da ciascun partner per lo svolgimento dell'obiettivo operativo.

PARTNER 1

€ 647.979,10

PARTNER 2

€ 357.228,05

PARTNER 3

€ 424.535,12

(*) In caso di variante progettuale autorizzata, si deve fare riferimento al nuovo piano finanziario e al nuovo cronoprogramma approvato.

Obiettivo operativo 2

Realizzazione di un kit per ogni patogeno e sue applicazioni su strumentazioni automatiche

Attività realizzate

Illustrare le attività realizzate specificando il ruolo di ciascun partner del progetto.

Tutte le attività di questo obiettivo sono di competenza del solo partner capofila **Diesse Ricerche Srl**.

ATTIVITA' 1: Produzione, valutazione e selezione degli anticorpi monoclonali e/o policlonali idonei all'impiego in test ELISA.

Questa attività propone, per ogni patogeno in studio, la produzione di reagenti (anticorpi poli e/o monoclonali) a massima specificità e sensibilità, seguendo protocolli di trattamento basati su esperienze acquisite o riscontrate in letteratura e antigeni di immunizzazione differentemente selezionati (batteri inattivati, frazioni antigeniche polisaccaridiche e/o proteiche, antigeni ricombinanti) in base alla patologia, tipologia di infezione e biomarcatore cercato.
Per semplificazione si suddivide per tipologia:

1-**Infezioni direttamente correlate al sistema urogenitale (urine e tamponi):**

-Per i patogeni urinari ***Escherichia coli***, ***Enterococcus faecalis***, ***Proteus mirabilis*** sono immunizzati topi Balb/c in parte sacrificati come fornitori di milze iperimmuni per la ricerca e selezione di Mab (monoclonal antibodies) tramite la tecnica di fusione cellulare mieloma /plasmacellula o come produttori di Pab (policlonal antibodies) ottenuti con la tecnica del fluido ascitico. Per ciascun antigene è stato riscontrato un titolo anticorpale significativo.

-Per entrambi i patogeni ***S. agalactiae*** e ***G. vaginalis***, è stato prodotto un antisiero policlonale in topo a partire da una patina batterica inattivata. Parallelamente, con lo stesso antigene, sono stati immunizzati topi tra i quali è stato possibile selezionare due donatori di materiale splenico per la preparazione di anticorpi monoclonali.

Gli antisieri, sono stati titolati con metodo Elisa indiretto. Quelli a titolo più alto sono stati purificati per affinità su Proteina A e le IgG, dopo titolazione, sono state in parte coniugate con Perossidasi di Rafano (HRP).

-Per ricerca e sierotipizzazioni di infezione da ***HSV1*** e ***HSV2***, da tamponi genitali, sono stati selezionati, da una precedente ricerca alcuni cloni risultati idonei per la messa a punto di un Elisa a "sandwich". I cloni sono stati caratterizzati per specificità, reattività antigenica e assenza di competizione. I più idonei sono stati espansi in ascite e le IgG purificate per affinità su Proteina A e successivamente studiati nello sviluppo dei kit.
Cloni individuati per HSV1:
- 44-2 isotipo IgG1 selezionato come catturante;
- 17-3 isotipo IgG1 specifico selezionato come tracciante;
- HSV2 38-B6 isotipo IgG1 selezionato come tracciante;
- 16-13 isotipo IgG2b selezionato come catturante.

Seguirà lo sviluppo del kit manuale.

-Per ***C. trachomatis***, sono state eseguite fusioni a partire da milze di Balb/c immunizzati con antigeni corrispondenti a LGV2 E.B. (Elementary Body) inattivati e E.B. estratti. In entrambi i casi sono stati selezionati cloni idonei come catturanti (LGV 40-47; D6-16) e come tracciante (LGV 47-14 e C6-3).
Dopo caratterizzazione per specificità, sensibilità, isotipizzazione e immunoreattività in Immuno Blotting (I.B.), i cloni di interesse sono stati espansi in vivo ed in seguito adattati all'espansione in vitro per ulteriori lotti di produzione.
Tutti i cloni prodotti sono stati purificati per affinità su Proteina A e i selezionati come traccianti sono stati coniugati con l'enzima HRP.
Dopo purificazione e coniugazione i cloni sono stati testati in Elisa utilizzando ciascuno sia come catturante (insolubilizzazione in fase solida), che come tracciante in un "sandwich" che utilizzava come antigene E.B. dopo trattamento con estraente. I più efficienti sono risultati i cloni esposti sopra.
Successivamente alla fase di validazione dei potenziali biomarcatori, selezionati tramite spettrometria di massa SELDI-ToF (relazione intermedia), abbiamo deciso di applicare altre tecniche proteomiche come l'elettroforesi bidimensionale computerizzata, così da

poter sfruttare la complementarità dei due approcci.

In breve, i campioni sono stati preparati come descritto di seguito:

Circa 8.5 mL del pool di urine positive sono stati concentrati (Vivaspin cut-off 3 kDa) fino ad 1 mL e arricchiti nel loro contenuto proteico con ProteoMiner (BIORAD). La stessa procedura è stata applicata al pool di campioni di urine negative. I campioni così ottenuti sono stati risolti tramite elettroforesi bidimensionale. Le mappe proteomiche sono state ottenute utilizzando per la focalizzazione isoelettrica (I dimensione) un gradiente di pH non-lineare coprente un intervallo da 3 a 10, e per la SDS-PAGE (II dimensione) un gradiente lineare di acrilamide che permette di separare proteine il cui peso molecolare è compreso in un intervallo di 8-200 kDa. I gel colorati con argento nitrato sono stati sottoposti a scansione mediante densitometria laser.

In figura 1 e 2 sono riportate le immagini digitalizzate delle mappe proteomiche relative, rispettivamente, al Pool di urine Positive e al Pool di urine Negative.

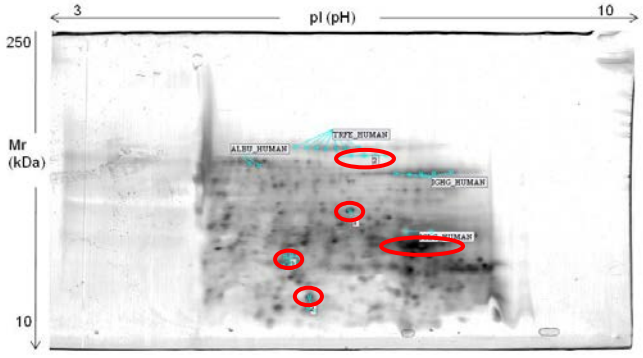


Figura 1: mappa proteomica colorata con argento nitrato ottenuta con il pool di Urine Positive

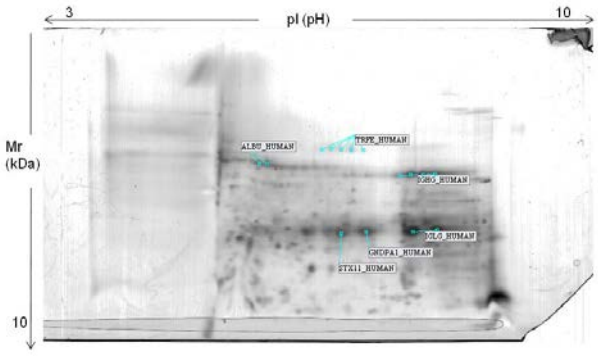


Figura 2: mappa proteomica colorata con argento nitrato ottenuta con il pool di Urine Negative

Su tali immagini digitalizzate è stata condotta un'analisi quali/quantitativa per mezzo di un software dedicato.

I risultati ottenuti dall'analisi d'immagine ci permettono di trarre le seguenti conclusioni:

- I pattern proteici dei due pool analizzati differiscono notevolmente sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo. In particolare, il pool delle urine positive presenta un contenuto proteico maggiore sia a livello quantitativo (contenuto proteico totale) che qualitativo (numero di specie proteiche all'interno del pool). Questi risultati confermano quanto già osservato nelle analisi precedenti, condotte per mezzo di una diversa tecnologia (SELDI-ToF/MS) utilizzando singolarmente i campioni di urine positive e negative.
- **Gli spot che rappresentano le differenze qualitative più marcate tra i due campioni in esame (cerchiati in rosso in Figura 1) hanno valori di peso molecolare del tutto congruenti con quelli dei potenziali biomarcatori di infezione da *Legionella* da noi selezionati e validati per mezzo dell'analisi SELDI-ToF/MS.**

2- Infezioni indirettamente correlate al sistema urinario: dosaggio di marcatori urinari

-Biomarcatori urinari per diagnosi di infezione da ***Legionella pneumophila***.

Obiettivo dello studio è la selezione di Mab specifici per antigeni urinari solubili conseguenti ad infezione da Legionella pneumophila serotipo 1, la specie più frequentemente coinvolta in casi umani. La legionellosi è una malattia infettiva grave e a volte a letalità elevata, per cui è necessaria una diagnosi rapida per una terapia efficace. Il metodo di diagnosi più usato è la ricerca di antigeni solubili nelle urine che possono risultare positive dopo solo 24 ore dall'infezione; per contro la sierologia è di scarso aiuto poiché la siero conversione avviene tardivamente con significato di retro diagnosi.

La lipoproteina 19kDa (comune a tutte le specie) ed antigeni lipopolisaccaridici di parete sono i principali antigeni urinari. Abbiamo estratto l'LPS dal batterio intero, seguendo protocolli presenti in letteratura e controllandone la validità antigenica sul kit commerciale di riferimento (gold standard kit Binax). L'antigene proteico 19K è stato prodotto come

antigene ricombinante nei nostri laboratori di biologia molecolare. Abbiamo utilizzato questi antigeni, separatamente, per immunizzare topi Balb/c. Un altro lotto di topi è stato immunizzati con un "estratto antigeni" da patina batterica opportunamente trattato per un arricchimento in antigeni solubili tra cui la 19K. Le fusioni eseguite hanno permesso l'individuazione di un numero significativo di Mab specifici per la 19K. Tra questi sono stati selezionati i cloni 17-19 e 16-5 caratterizzati per specificità (reattività con altre specie batteriche), immunoreattività (test Elisa e I.B.) su batteri interi, LPS estratto, 19K ricombinante, isotipo (IgG2b) e competitività reciproca. Per LPS la maggior parte di Mab selezionati sono risultati di classe IgM e solo 1 clone di classe IgG1. Questi risultati sono plausibili considerando il tipo di risposta umorale indotta da antigeni polisaccaridici, tipicamente T indipendente, con risposta umorale principalmente rappresentata da anticorpi IgM. La scarsa immunogenicità di LPS e la necessità di avere Mab non solo specifici ma ad alta affinità (quindi Ab di classe IgG) per LPS, che rappresenta l'antigene più rappresentato, ci induce ad aprire uno studio non previsto nella pianificazione di questo progetto che corrisponde allo studio ed acquisizione di metodiche per la realizzazione di vaccini glicoconiugati nei quali antigeni polisaccaridici capsulari sono "coniugati" con proteine che fungono da carrier e che inducono immunità cellulo-mediata e memoria immunologica.

Parallelamente si prosegue alla verifica di fattibilità di kit di identificazione con i Mab selezionati le cui caratterizzazioni sono riportati di seguito.

CARATTERIZZAZIONE ANTIGENI E ANTICORPI

19K

Proteina 19K coniugata con l'istidina. Per l'immunizzazione è stata utilizzata la proteina 19K coniugata con la GST, la proteina 19-His è stata utilizzata per tutti i test di screening e di specificità.

LPS

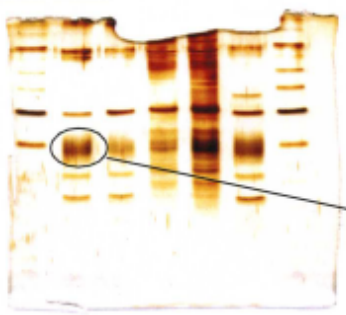
ESTRAZIONE

-Crescita batteri → 48 – 72 h
- Sono stati raccolti e sospesi in acqua. Leggere A_{660} → circa 1.0.
(abbiamo raccolto 8 piastre e le abbiamo diluite in 22 ml di H_2O)
- Diluizione 1:15 con H_2O. Sospensione totale ≈ 330 ml.
- Sono stati messi ≈ 165 ml di questa soluzione in 2 boli da 400 ml con tappo a vite e centrifugati per 2' a 8.000 rpm.
- Il pellet era raccolto in un unico bolo e solubilizzato in 11 ml di lising buffer

LISING BUFFER:
2% SDS
4% 2-mercaptoetanolo
10% glicerolo
1 M Tris pH 6,8
0,05% blu di bromofenolo

Segue incubazione di 10' a 100°C (a bagnomaria)
- Erano poi aggiunti 2,2 ml di Proteinasi K [alla concentrazione di 2,5 mg/ml in lising buffer]
- Segue incubazione a 60°C per 1 h (a bagnomaria)
- Abbiamo raccolto la sospensione e l'abbiamo suddivisa in due boli piccoli con tappo a vite.
- È stata fatta prima una centrifuga di 3' a 20.000 rpm, dopo di chè, visto che il pellet si separava difficilmente, è stata fatta una nuova centrifuga di 10' sempre a 20.000 rpm
- Abbiamo quindi recuperato il supernatante (≈ 6,5 ml) contenente l'LPS ma comunque conservato anche il pellet.

Elettroforesi:



Lane 1: standard
Lane 2: LPS
Lane 3: Pellet
Lane 4: Batterio Intero
Lane 5: Batterio Intero Inattivato
Lane 6: Batterio inattivato e Digerito con Proteinasi K
Lane 7: standard

Banda corrispondente all'LPS

ELISA sandwich su BINAX

		Binax Binax*	33B2 33B2*	17-19 16-5*	16-5 17-19*	Fase Solida Coniugato
LPS	1:500.000	3217	3334	124	152	
	1:100.000	2502	2196	140	141	
	1:200.000	1526	1278	117	151	
	1:400.000	848	669	124	150	
	1:800.000	504	387	117	133	
	1:1.600.000	335	259	121	150	
	1:3.200.000	249	-	-	-	

33B2

Anticorpo monoclonale di sottoclasse IgG1.

ELISA Indiretta e Sandwich su Legionella Estratto

FS	primario	AB*	ug/ml	OD
leg estratto 1ug/ml	33B2	anti-topo	5	2547
			2,5	2717
			1,3	2589
			0,6	2697
			0,3	2427
			0,2	2048
			0,1	1474
			0,04	1052
			0,02	645
			0,01	414
			0,005	248
			0,002	144

FS	antigene	AB*	Leg Estr. ng/ml	OD
33B2 (40 ug/ml)	Leg estratto	33B2	12,5	3381
			6,3	1720
			3,1	998
			1,6	554
			0,8	415
			0,4	369
			0,2	241

ELISA Sandwich su LPS: vedi prova in caratterizzazione LPS

ELISA Sandwich su 19K-His

		33B2 33B2*
19K ug/ml	1	172
	0,5	179
	0,25	172
	0,12	198
	0,06	126
	0,03	120

TEST DEL PERIODATO PER TESTARE LA SPECIFICITA' DEL 33B2 PER L'LPS

	33B2									
	5 ug/ml					1,25 ug/ml				
	Condizioni normali	Tampone sodio	Sodio Periodato	% Riduzione Acetato	% Riduzione Periodato	Condizioni normali	Tampone sodio	Sodio Periodato	% Riduzione Acetato	% Riduzione Periodato
C3										
1:200000	2593	1981	722	21	71	2384	1981	458	13	80
	2498	2016	759			2228	2016	462		
1:400000	1550	1348	318	16	79	1209	1087	208	13	83
	1574	1279	352			1196	1002	204		
C4										
1:200000	3334	3133	3161	4	3	3379	3161	3434	9	2
	3235	3176	3206			3349	2954	3148		
1:400000	3157	3189	2985	2	6	3407	3042	3251	10	5
	3200	3027	2988			3346	3049	3173		

C3 = Batterio intero inattivato

C4 = Batterio intero inattivato e Digerito

	17-19									
	5 ug/ml					1,25 ug/ml				
	Condizioni normali	Tampone sodio acetato	Sodio Periodato	% Riduzione Acetato	% Riduzione Periodato	Condizioni normali	Tampone sodio acetato	Sodio Periodato	% Riduzione Acetato	% Riduzione Periodato
C3										
1:2500	1744	1791	1424	-5	22	1598	1608	1447	-6	19
	1691	1830	1269			1773	1981	1269		
1:5000	1429	1442	1085	-4	14	1366	1498	1199	-7	21
	1191	1282	1172			1355	1401	959		

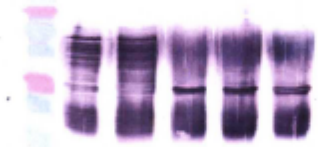
17-19 & 16-5

Anticorpi monoclonali anti-19K selezionati da immunizzazione con 19K-GST (ricombinante).
Sottoclasse IgG2b.

ELISA Sandwich

19K ng/ml	Binax Binax*	Binax 17-19*	Binax 16-5*	33B2 33B2*	17-19 16-5*	16-5 17-19*
1000	1553	3373	2619	172		
500	1362	3303	2789	179	3590	3687
250	1156	2928	2713	172	3438	3693
120	864	3237	2471	198	3362	3714
60	640	3091	1928	126	3372	3423
30	498	3113	1463	120	3743	3567
15					3373	3482
7,5					3235	3649
3,8					2191	3126
1,9					1338	2408
0,9					791	1481
0,5					422	834
0,23					249	520
0,12					220	429
0,06					172	329
0,03					120	206
Bianco					99	139

Blotting



Lane 1: Standard
Lane 2: Batterio Intero
Lane 3: Batterio Intero Inattivato
Lane 4: Batterio Intero Inattivato e Digerito con Proteinasi K
Lane 5: LPS arricchito (supernatante)
Lane 6: Pellet

Ab I°: 33B2 10ug/ml
Ab II°: A-5153* (anti-mouse*)

Lane 1: Standard
Lane 2: Batterio Intero
Lane 3: Batterio Intero Inattivato
Lane 4: Batterio Intero Inattivato e Digerito con Proteinasi K
Lane 5: LPS arricchito (supernatante)
Lane 6: Pellet

Ab I°: 17-19 10ug/ml
Ab II°: A-5153* (anti-mouse*)

ELISA: studio di competizione tra cloni

	17-19* POD (1:40000)			
16-5 ug/ml	Leg. Estr.	% Inibizione	19K-GST	% Inibizione
0,5	653	-0,2	2186	13,6
0,1	573	12,1	2339	7,5
0,05	708	-8,6	2342	7,4
0,02	720	-10,4	2546	-0,7
17-19 ug/ml				
0,1	381	41,6	1261	50,1
0,05	403	38,2	1727	31,7
Bianco	652	-	2529	-

I due cloni non competono tra loro.

STUDIO DELLE URINE

	Binax Binax*	33B2 33B2*	17-19 16-5*
3851	2001	268	
6603	2539	781	
FI01	659*	173	95
407.83	3991	2110	2837
407.95	2015	344	88
409.88	1480	385	139
VC03	128	172	144
SC01	166	157	125
TZ02	175	170	86
CD13	120	101	77

- 0,5 ml Urina Negativa SC01
- 0,5 ml Urina Negativa TZ02
- 0,5 ml Urina Negativa VC03
- 0,5 ml Urina Negativa CD13
- 0,5 ml Urina Positiva 3851 (valore positivo in Binax, negativo alto per Diesse)
- 0,5 ml Urina Positiva 6603
- 0,5 ml Urina Positiva FI01 (valore positivo basso in Binax, negativo mosso per Diesse)
- 0,5 ml Urina Positiva 407.83
- 0,5 ml Urina Positiva 407.95 (valore positivo in Binax, risultato dubbio, a cut off, per Diesse)
- 0,5 ml Urina Positiva 409.88 (valore positivo in Binax, risultato dubbio, a cut off, per Diesse)

Controllo urine a diluizione

		Binax Binax*	33B2 33B2*	17-19 16-5*	16-5 17-19*
URINA 1	**Intero**	982	444	104	192
	1:2	667	291	93	148
	1:4	409	219	95	137
	1:8	287	212	132	180
	1:16	224	189	-	-
URINA 4	**Intero**	3148	1626	1762	2560
	1:2	3220	1724	1239	1997
	1:4	2878	1261	749	1166
	1:8	2147	867	435	697
	1:16	1478	549	-	-
URINA 5	**Intero**	1427	709	266	355
	1:2	909	460	174	248
	1:4	508	271	107	129
	1:8	370	206	101	122
	1:16	277	-	-	-
URINA 6	**Intero**	1036	216	89	93
	1:2	772	191	84	105
	1:4	550	175	87	113
	1:8	620	149	95	100
	1:16	274	133	-	-
URINA 407.83	**1:8**	3393	-	807	999
	1:16	3120	-	383	494
	1:32	2818	-	245	297
	1:64	2075	-	-	-

-Biomarcatore urinario per diagnosi di infezione da ***Streptococco pneumoniae***

Obiettivo: produzione e identificazione di Mab anti antigene urinario.

Lo pneumococco è la principale causa di polmoniti acquisite in comunità con mortalità significativamente alta in neonati e anziani. Un metodo di diagnosi rapido e affidabile è la ricerca di antigeni polisaccaridici nelle urine dei pazienti, utile strumento in quanto può permettere al clinico di ottimizzare la terapia antimicrobica con buoni risultati clinici. I principali antigeni polisaccaridici dello *Pneumococco* sono l'antigene capsulare, che determina 90 sierotipi ed induce una immunità protettiva, e l'antigene polisaccaridico della parete batterica, o polisaccaride C (Cps), che è a comune a tutti i sierotipi. Oltre agli antigeni capsulari, abbiamo ritenuto il Cps di particolare interesse per selezionare anticorpi in grado di riconoscere antigeni urinari comuni a tutti i sierotipi. Le considerazioni fatte per l'antigene urinario di Legionella pneumophila sulla immunogenicità dei polisaccaridi, sono riconducibili anche agli antigeni dello pneumococco per i quali sarà seguita la stessa strategia di studio di glicoconiugati.

Il progetto è iniziato con l'immunizzazione di 2 gruppi di 4 Balb/c ciascuno, con Pneumovax, vaccino polisaccaridico non coniugato dei principali 23 sierotipi patogeni. Sono stati seguiti 2 trattamenti differenti nelle dosi e nel loro numero: 100ugr totali/topo in 5 settimane; 140 ugr totali/topo in 15 settimane.

Ulteriori schemi di immunizzazione saranno fatti con pneumococco inattivato, antigene Cps purificato (CWPS Multi Statens Serum Instutute) e coniugato con proteina carrier e vaccino umano glicoconiugato.

ATTIVITA' 2: Realizzazione dei kit diagnostici su piastra ELISA

-Per *C. albicans*: riallineato positivamente il kit alla sensibilità del prototipo 2008 con materiali e metodi simili ad eccezione della fase solida (FS) stabilizzata chimicamente con "postcoating".

Effettuate prove di ottimizzazione tamponi estraenti/patina batterica per maggiore sensibilità.

In corso di verifica stabilità curva di sensibilità in base logaritmica per controlli di produzione, rappresentata per ogni punto da un estratto di una sospensione batterica a pfu/ml note.

Ottimizzazione di un estratto per produzione del calibratore e siero di controllo per

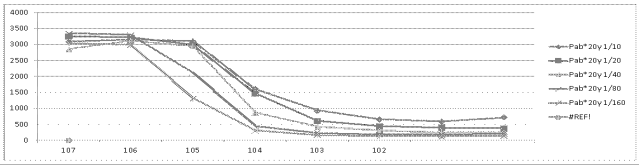
l'allineamento del kit in automazione su Chorus.

-Per *S. agalactiae:* ripristinato il kit prototipo con gli stessi materiali e metodi ad eccezione della FS statizzata con "postcoating". In corso la preparazione di un nuovo lotto di antisiero in coniglio possibilmente a maggior titolo per una migliore sensibilità.

-Per *G. vaginalis*: ripristinato il kit prototipo con FS stabilizzata con "postcoating". In corso la preparazione di un nuovo lotto di policlonale in topo tramite la tecnica dell'ascite.

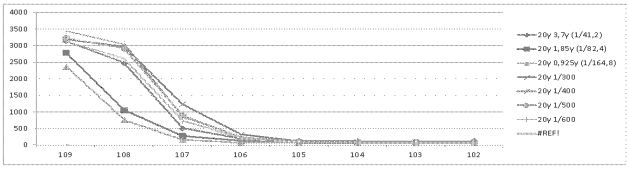
Test manuale Candida albicans

	Pab*20y				Coating
Conta batterica	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	Pab* (1/2)
10^7	3084	3260	2851	3350	3033	
10^6	3162	3225	3124	3300	2999	
10^5	3117	2992	2953	2131	1321	
10^4	1609	1470	874	447	320	
10^3	943	612	428	241	178	
10^2	664	448	319	188	136	
	595	404	256	183	132	
	721	379	258	217	143	



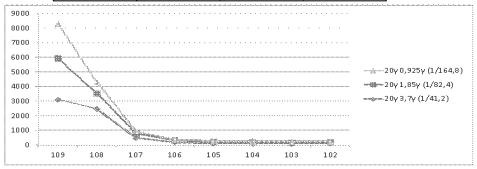
Test manuale Strepcococco agalactie - GBS

	20y						Coating
Conta batterica	3,7y (1/41,2)	1,85y (1/82,4)	0,925y (1/164,8)	1/300	1/400	1/500	1/600	Pab* (1/2)
10^9	3146	2789	2372	3199	3438	3246	3136	
10^8	2486	1058	764	2969	3051	2913	2612	
10^7	522	285	167	1245	871	910	740	
10^6	203	135	80	329	257	232	216	
10^5	139	94	71	120	110	105	102	
10^4	125	85	67	97	86	93	95	
10^3	112	80	65	90	88	97	82	
102	129	80	65	93	89	90	82	



Test manuale Gardnerella vaginalis

	20y		Coating
Conta batterica	3,7y (1/41,2)	1,85y (1/82,4)	0,925y (1/164,8)	Pab* (1/4)
10^9	3146	2789	2372	
10^8	2486	1058	764	
10^7	522	285	167	
10^6	203	135	80	
10^5	139	94	71	
10^4	125	85	67	
10^3	112	80	65	
102	129	80	65	



Chlamydia trachomatis :

con i Mab selezionati, è stato sviluppato un test a " sandwich" la cui sensibilità è stata testata su di una curva preparata a partire da E.B. in comparazione con la sensibilità riscontrata sulla stessa curva con il kit Oxoid (immunoenzimatico) preso come riferimento

data l'alta sensibilità riportata e comparabile ai metodi molecolari disponibili.

SCHEDA DI CONFRONTO KIT PROTOTIPO DIESSE/ KIT OXOID IDEIA

CURVA DI CONTROLLO :

Cellule Chlamydia trachomatis (ceppo Diesse) sospensione in PBS alla concentrazione proteica di 20 ug/ml

Diluita la sospensione in tampone estraente DIESSE alle conc finali di 1-0,1-0,01-0,001 ug/ml

test OXOID IDEIA PCE Chlamydia cod K603211-2

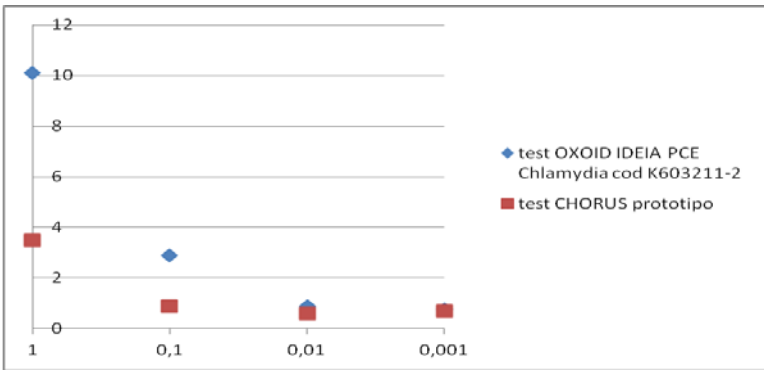
CONC ug/ml	INDEX	RES
1	10,1	POS
0,1	2,9	POS
0,01	0,88	B/L
0,001	0,76	NEG
0	0,6	NEG

sensibilità 0,01 ug/ml

test CHORUS prototipo

CONC ug/ml	INDEX	RES
1	3,5	POS
0,1	0,9	B/L
0,01	0,6	NEG
0,001	0,7	NEG
0	0,7	NEG

sensibilità 0,1 ug/ml



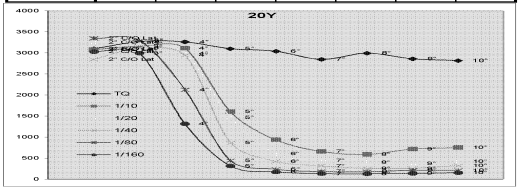
Lo studio proseguirà cercando di riportare la sensibilità del nostro test con quella Oxoid comparando la fase solida (Mab catturante), il tracciante, e il sistema di rilevazione.

CANDIDA ALBICANS

PROVA SANDWICH SU PATINA ESTRATTA

-Pab 001/s in FS/$_E$ 20v del 25/11/08;
-Incubazione 45'+45' a 37°C;
-Sviluppo 15' con Sub Pod, Stop e lettura a 450-620nm.
-CONSEGNATA CURVA DA LAB. BATTERIOLOGIA TESTATA CON TEST LATTICE →C/O 2° DILUIZIONE Log;
-Letta OD patina di partenza a 600nm. 1° Campione → OD.

OD 450/620 Conta batterica	Coating Pab° (1/2)	dil	20V TQ	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	10° dil
	103	2° C/O Lat	3102	3084	3260	2851	3350	3033	2821
	103	3°	3274	3162	3225	3124	3300	2999	756
	103	4°	3266	3117	2992	2953	2131	1321	425
	103	5°	3104	1609	1470	874	447	320	329
	103	6°	3043	943	612	428	241	178	214
6 10^2		7°	2851	664	448	319	188	136	159
/		8°	2998	595	404	256	183	132	/
/		9°	2864	721	379	258	217	143	/



ATTIVITA' 3: Sperimentazione Interna

Per ciascun kit, descritto nell'attività 2, è stata eseguita la valutazione interna per la sensibilità (espressa come UFC/ml per i batterici e Candida; come EB/ml per Chlamidia) e specificità verificandone la reattività su ceppi da collezione dei principali patogeni urogenitali Gram+ e Gram-. La valutazione su tampone è in corso di organizzazione.

ATTIVITA' 4: Automazione dei test su strumento CHORUS

Per ciascun argomento , il kit è stato trasferito in automazione su Chorus, ottimizzando i vari componenti (FS, tracciante, tempi di reazione ecc) su una curva di calibrazione interna mediamente a 4 punti rappresentativi per la sensibilità del test. Obiettivo di tale attività era di ottenere in automazione, a parità di specificità, una sensibilità >= a quella del metodo manuale. Questa attività è stata realizzata utilizzando campioni da collezione opportunamente diluiti ed estratti.

ATTIVITA' 5: Sperimentazione interna dei kit in automazione su strumento CHORUS

Per ciascun argomento, è stato prodotto almeno un lotto sperimentale (001) con materiali, metodi e strumentazione del reparto di produzione finale dei kit. I vari componenti il kit (FS, tracciante , diluenti calibratori ecc) sono stati prodotti ed allineati nei termini stabiliti nella attività 4.

Una volta superato il controllo vrac (device definitivo) in termini di sensibilità e specificità su una curva di calibrazione interna e ceppi da collezione , il lotto è stato utilizzato per una sperimentazione "in house" che ha richiesto la collaborazione di Strutture ospedaliere come fornitori di tamponi urogenitali o campioni di urine. Nel caso di

tamponi, il reperimento di tali campioni ha presentato varie difficoltà data l'invasività del prelievo

La valutazione delle performance è stata eseguita confrontando i risultati di ciascun campione su Chorus con quelli dell'Ospedale di provenienza (reference method) confronto con metodiche microbiologiche standard (gold standard) come l'uso di terreni cromogeni e/o identificazione biochimica oltre ad una analisi al microscopi e colorazione di GRAM a quando disponibile test di agglutinazione al lattice.

Per il kit C. thrachomatis , visto la difficoltà del reperimento dei campioni e la complessità della metodica, abbiamo deciso di verificarre clinicamente il test presso un laboratorio di analisi ospedaliero interessato tramite il nostro distributore Mediclim in Romania (All.1) .

La sperimentazione interna ha incluso la collaborazione con l'Ospedale Gaslini di Genova (Dott.Bandettini) e con l'Azienza Ospedaliera Universitaria Senese (laboratorio di microbiologia Dott.Cusi). Tali sperimentazioni sono finalizzate alla verifica dell'efficacia dei KIT sviluppati per la ricerca di antigeni quali Streptococco agalactiae ,Candida albicans e Gardnerella vaginalis, in tamponi vaginali di pazienti afferenti ai laboratori prima citati.

Per la verifica microbiologica sono stati utilizzati:

- terreno solido su piastra petri: cromogeno (chromagar orientation), sabouro (per Candida), agar sangue coniglio (per Gardnerella v.) , agar sangue montone e cromogeno streptoB(per Streptococco B).

- terreno liquido: Eugon Broth

Api→identificazione biochimica

-Colorazione Gram

-Lattice Strepto slides

Stumento Chorus : ciclo chorus 815 (circa 2h)

Di seguito la descrizione di sedute significative nel corso di tale fase

.

SPERIMENTAZIONE IN COLLABORAZIONE CON L'OSPEDALE GASLINI DI GENOVA e AZIENDA OSPEDALIERA SENESE

Streptococco B:

standard ospedale									standard diesse				
Enter the data into this table:	Enter the data into this table:		Reference standard is positive	Reference standard is negative					**Enter the data into this table:**		Reference standard is positive	Reference standard is negative	
		Test is posit	19	23						Test is positive	24	11	
		Test is nega	8	18						Test is negative	2	25	
Enter the required confidence interval (eg, 95%) here:	Enter the require	95							Enter the required confidence interval (eg, 95%) here:	95			
RESULT:	RESULT:								RESULT:				
Sensitivity:	Sensitivity:	0,7037037	CI: 0,5152 to 0,8415						Sensitivity:	0,923076923	CI: 0,7586 to 0,9786		
Specificity:	Specificity:	0,4390244	CI: 0,2989 to 0,5896						Specificity:	0,694444444	CI: 0,5314 to 0,82		
Positive likelihoo	Positive likelihoo	1,2544283	CI: 0,871 to 1,807						Positive likeli	3,020979021	CI: 1,824 to 5,005		
Negative likelihc	Negative likelihc	0,6748971	CI: 0,343 to 1,327						Negative like	0,110769231	CI: 0,029 to 0,427		
Diagnostic odds r	Diagnostic odds r	1,8586957	CI: 0,663 to 5,211						Diagnostic od	27,27272727	CI: 5,466 to 136,083		

Commento:

buona sensibilità dei risultati ottenuti con il metodo diesse (confronto chorus-identificazione interna)

Non abbiamo riscontrato una buona corrispondenza dei risultati chorus rispetto a quelli ospedalieri, ciò puo dipendere dal fatto che la risposta ospedaliera è operatore dipendente oppure il nostro metodo risulta eccessivamente sensibile questo è stato dimostrato dall'attenta analisi di un campione refertato come campione ospedaliero negativo.Quanto detto è compatibile con il campione n°8

risultato ospedaliero negativo

campione su chorus positivo

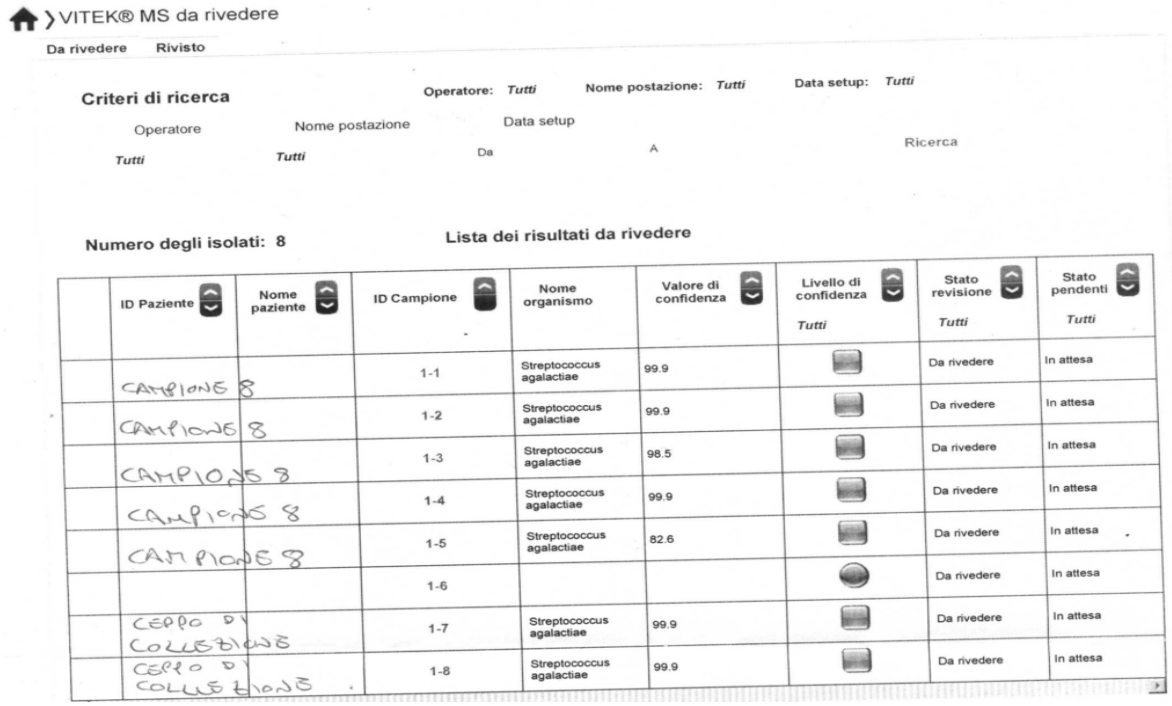
Colonia streptococco B isolata ed analizzata su chorus positiva

28.11.13								
	CAMPIONE	ch2	ch4	ch6	ch8	ch10	ch12	ch12-ch2
	BIANCO	41	83	113	141	136	144	103
10^7	-1	48	304	464	566	606	639	591
10^6	-2	40	160	238	289	302	318	278
10^4/5	-3	43	99	139	172	169	178	135
10^4	-4	43	85	119	154	145	152	109
	n.4	49	242	364	442	470	491	442
	n.4 (patina mista)	45	77	107	138	131	138	93
	n.8	49	301	462	573	613	659	610
	n.8 (patina mista)	40	119	173	215	216	227	187
	n.8(colonia isolata)	62	375	575	711	752	787	725
	n.1 (patina mista)	44	87	120	147	145	152	108
	n.3 (patina mista)	44	407	616	751	808	845	801
	n.7 (patina mista)	39	91	127	155	157	163	124

* i test con ZIM A e B non hanno reagito bene

Si Riportano di seguito i risultati effettuati con il Maldi Toff (laboratorio microbiologia ospedale di Siena) sulla colonia isolata dal campione 8 a confronto con il ceppo di

Streptococco proveniente dalla batterioteca (tls)



VITEK® MS da rivedere

Da rivedere Rivisto

Criteri di ricerca — Operatore: *Tutti* Nome postazione: *Tutti* Data setup: *Tutti*

Operatore: *Tutti* | Nome postazione: *Tutti* | Data setup: Da | A | Ricerca

Numero degli isolati: 8 — Lista dei risultati da rivedere

	ID Paziente	Nome paziente	ID Campione	Nome organismo	Valore di confidenza	Livello di confidenza *Tutti*	Stato revisione *Tutti*	Stato pendenti *Tutti*
	CAMPIONE 8		1-1	Streptococcus agalactiae	99.9		Da rivedere	In attesa
	CAMPIONE 8		1-2	Streptococcus agalactiae	99.9		Da rivedere	In attesa
	CAMPIONE 8		1-3	Streptococcus agalactiae	98.5		Da rivedere	In attesa
	CAMPIONE 8		1-4	Streptococcus agalactiae	99.9		Da rivedere	In attesa
	CAMPIONE 8		1-5	Streptococcus agalactiae	82.6		Da rivedere	In attesa
			1-6				Da rivedere	In attesa
	CEPPO DI COLLEZIONE		1-7	Streptococcus agalactiae	99.9		Da rivedere	In attesa
	CEPPO DI COLLEZIONE		1-8	Streptococcus agalactiae	99.9		Da rivedere	In attesa

Entrambe le colonie sono state identificate come Streptococco agalactiae dato confermato dall'api (vedi sotto):

ceppo di collezione

OTTIMA IDENTIFICAZIONE	
GALLERIA	API 20 STREP V7.0
Profilo	3 4 2 3 0 1 4
Nota	CONFERMARE CON TEST SIEROLOGICI

Taxa significativo	% ID	T	Test atipici			
Streptococcus agalactiae	99.9	0.72	LAP 99%			

Taxon seguente	% ID	T	Test atipici			
Streptococcus porcinus	0.1	0.0	HIP 5%	ESC 99%	LAP 97%	MAN 88%
			SOR 88%	LAC 83%		

Colonia isolata da campione 8:

OTTIMA IDENTIFICAZIONE	
GALLERIA	API 20 STREP V7.0
Profilo	3 4 2 3 0 1 5
Nota	CONFERMARE CON TEST SIEROLOGICI

Taxa significativo	% ID	T	Test atipici			
Streptococcus agalactiae	99.9	0.67	LAP 99%			

Taxon seguente	% ID	T	Test atipici			
Streptococcus group L	0.1	0.01	VP 1%	LAP 100%	LAC 75%	GLYG 98%

Conclusione: il campione 8 è positivo per streptococco B. Sarà molto importante chiarire la sensibilità di risposta ospedaliera ed effettuare una sperimentazione esterna.

Campioni per la ricerca di Candida albicans:

ospedale standard						ospedale diesse			
Enter the data into this table:		Reference standard is positive	Reference standard is negative		Enter the data into this table:		Reference standard is positive	Reference standard is negative	
	Test is positive	7	5	12		Test is positive	14	6	20
	Test is negative	0	19	19		Test is negative	1	34	35
		7	24	31			15	40	55
Enter the requir	95				Enter the required confidence i	95			
RESULT:					RESULT:				
Sensitivity:	1	CI: 0,6457 to 1			Sensitivity:	0,933333333	0,7018 to 0,9881		
Specificity:	0,791666667	CI: 0,5953 to 0,9076			Specificity:	0,85	0,7093 to 0,9294		
Positive likelihc	4,8	CI: 2,201 to 10,47			Positive likelihood ratio:	6,222222222	2,939 to 13,172		
Negative likelih	0	#NUM!			Negative likelihood ratio:	0,078431373	0,012 to 0,523		
Diagnostic odds	#DIV/0!	#DIV/0!			Diagnostic odds ratio:	79,33333333	8,733 to 720,724		

Commento: buona sensibilità e specificità con entrambe i metodi di riferimento.

ATTIVITA' 6: Sperimentazione esterna e allestimento del File Tecnico secondo quanto richiesto dalla nromativa europea ISO.

Prevista nel secondo anno di attività.

L'allestimento del File Tecnico è in corso di completamento, essendo quest'ultimo correlato all'esito della sperimentazione esterna. Per argomento in studio, sono stati prodotti lotti significati da 25 kit (1kit corrisponde a 36 determinazioni) che hanno permesso la realizzazione dei dati sperimentali del TF (in fase di completamento) e la sperimentazione esterna anch'essa in fase di completamento. I protocolli per le sezioni H e J del tecnica file per i CE, sono stati determinati con la collaborazione del Rgolatory Affair della Diesse S.p:acome pure per i protocolli della sperimentazione esterna per il cui allestimento sono stati stipulati contratti o collegamenti con centri ospedalieri o laboratori di analisi per una verifica sul campo.

Di seguito alcuni esempi sperimentali e documentali

1.Controllo vrac (lotto 002) per TF e sperimentazione esterna

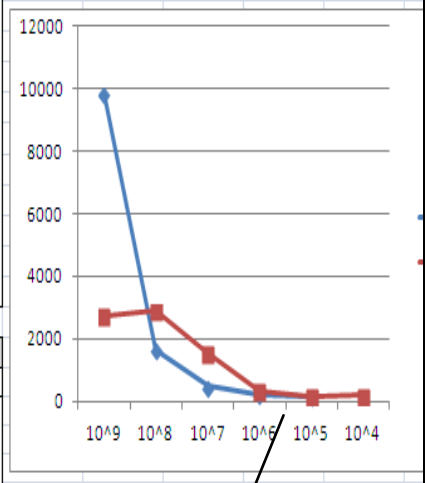
STREPTOCOCCUS AGALACTIAE (ceppo da DIESSE spa 152 222/c lot 01 07/11/03 a n152 17.09.2010 lotto 001 batt 004/tls (posizione B1 in Batterioteca))

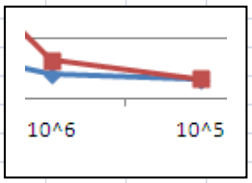
BULK

h4	ch6	ch8	ch10	ch12	ch12-ch2	media	campione	curva	KIT	coating	tracciante	substrato
11	777	921	1026	1070	1022	879	calibratore		Strepto	Ab 001 20γ	Ab 010/s 3γ	biolegend
43	540	653	732	771	735							
997	2989	2989	9997	2989	2710	2710	1Mf	10^9				
997	9997	9997	9997	9997	9866	2877	-1	10^8				
990	9997	9997	9997	2989	2877							
57	1163	1398	1610	1647	1591	1541	-2	10^7				
78	1086	1290	1458	1542	1491							
07	287	348	386	384	341	320	-3	10^6				
84	263	307	333	342	299							
67	191	233	250	237	191	168	-4	10^5				
7	150	178	190	183	144							
09	166	185	203	220	188	188	-5	10^4				
90	779	929	1040	1102	1060	1100	calibratore					
63	852	1045	1164	1197	1139							
1	115	133	133	121	80	85	bianco					
5	107	110	118	130	90							

VRAC

h4	ch6	ch8	ch10	ch12	ch12-2	media	campioni	curva	KIT	coating	tracciante	substrato
92	897	1055	1172	1227	1172	1076	calibratore		Strepto	Ab 001 20γ	Ab 010/s 3γ	biolegend
96	750	889	987	1027	979							
997	9997	2989	9997	9997	9799	9799	1Mf	10^9				
267	1949	2290	2691	2991	2900	1633	-1	10^8				
16	318	378	418	431	385	475	-2	10^7				
94	445	526	580	603	564							
5	167	192	211	219	186	207	-3	10^6				
42	201	237	262	268	228							
61	186	201	214	209	160	160	-4	10^5				
84	589	695	777	809	761	761	calibratore					
7	154	171	185	187	143	149	bianco					
84	172	185	199	199	154							





Curva: 1Mf in Eugon Broth 1X. Sono state effettuate diluizioni seriali. E' stato seminato il punto -5 su terreno agar sangue di montone. la curva è stata incubata a 37°C per 2h e sono stati estratti tutti i punti della curva con una soluzione estraente di HNO_2 (sviluppato in ambiente di reazione per reazione tra Sodio Nitrito-R_1- e Acido Acetico-R_2-) e soluzione neutralizzante di Ammonio Carbonato-R_3-, prima dell' effettuazione del test. L'estrazione avviene nei seguenti rapporti dei reazione: 100µl di sospensione + 125 µl di R_1 +125µl di R_2 +250µl di R_3.

Chorus: 1155

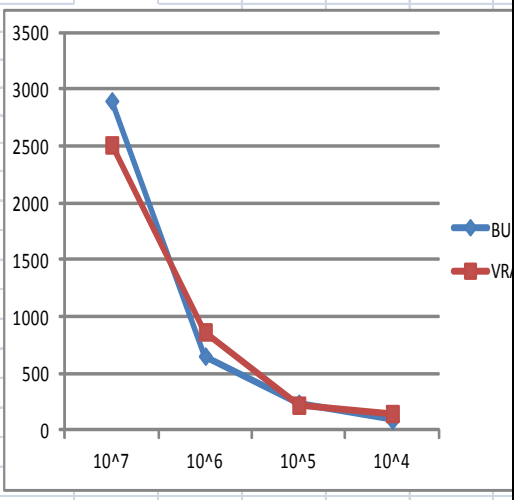
Calibratore: 1:6400 antirabbit R5506 in diluent2

Sensibilità tra 10^6-10^5

GARDNERELLA VAGINALIS (ATCC 49145 106/C lotto 006 (posizione E10 Batterioteca TLS))

BULK											
h4	ch6	ch8	ch10	ch12	ch12-ch2	media	campione	curva	coating	tracciante	substrato
10	746	899	1003	1030	971	809	calibratore		004/s 20γ	004 15γ	biolegend
36	498	600	668	686	646						
388	2989	2989	9997	2989	2901	2901	1Mf	10^7			
689	2989	2989	9997	9997	9893						
93	452	527	580	612	573	655	-1	10^6			
70	574	669	739	779	737						
55	219	261	290	292	252	240	-2	10^5			
62	220	244	261	268	228						
1	109	128	141	132	91	91	-3	10^4			
03	793	925	1017	1075	1032	827	calibratore				
14	482	573	632	663	622						
19	151	173	184	179	138	138	bianco				
VRAC											
h4	ch6	ch8	ch10	ch12	ch12-2	media	campioni	curva	coating	tracciante	substrato
12	607	734	821	838	783	801	calibratore		004/s 20γ	004 15γ	biolegend
41	639	772	858	867	818						
514	9997	2989	9997	9997	9906	2514	1Mf	10^7			
31	483	581	647	654	608	869	-1	10^6			
55	860	1007	1111	1171	1129						
47	208	243	267	271	236	223	-2	10^5			
39	193	223	244	250	210						
42	176	191	201	197	150	150	-3	10^4			
59	1171	1356	1514	1576	1524	1213	calibratore				
97	724	843	923	953	901						
32	197	216	235	254	219	171	bianco				
06	214	223	229	213	123						

	BULK	VRAC
10^7	2901	2514
10^6	655	869
10^5	240	223
10^4	91	150



Curva: 1 Mf in PBS 1X sterile. E' stato estratto 1 Mf con una soluzione estraente di HNO_2 (sviluppato in ambiente di reazione per reazione tra Sodio Nitrito-R_1- e Acido Acetico-R_2-) e soluzione neutralizzante di Ammonio Carbonato-R_3-, prima dell' effettuazione del test. L'estrazione avviene nei seguenti rapporti dei reazione: 100µl di sospensione + 125 µl di R_1 +125µl di R_2 +250µl di R_3. Dopo aver estratto 1Mf sono state effettuate delle diluizioni scalari in PBS 1X.

La semina è stata effettuata su una curva in parallelo in PBS ,su agar sangue di coniglio.

Chorus: 1155

Calibratore: 1:30.000 antimause 9637 in diluent 2

Sensibilità tra 10^6-10^5

CANDIDA (ATCC 10231 17.09.2010 lotto 001 batt 003/tls (posizione batterioteca A8))

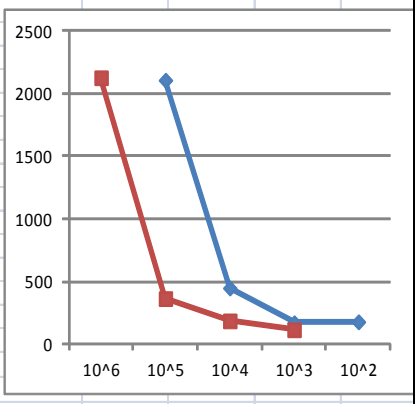
BULK

ch4	ch6	ch8	ch10	ch12	ch10-ch2	media	campione	curva batt.	coating	tracciante
902	845	926	948	916	902	815	calibratore	1:8000 anti rabbit(R5506)	lotto 003/s 15 γ	lotto 005 40γ
664	636	685	693	667	642					
657	874	953	956	902	900					
2558	2147	2213	2211	2213	2107	2108	1 Mf	10^5		
2558	2213	2213	2290	2390	2221					
1366	1912	2036	2086	1992	1995					
615	456	484	497	497	460	450	-1	10^4		
618	444	470	471	461	426					
617	444	497	511	496	465					
926	739	818	834	810	784	982	calibratore	1:8000 anti rabbit(R5506)		
1756	1067	1152	1170	1147	1121					
1018	1000	1072	1086	1062	1041					
236	190	200	205	206	172	176	-2	4x10^3		
239	190	205	208	205	168					
249	202	224	227	222	187					
250	207	222	227	227	189	180	-3	2x10^2		
238	183	203	209	203	166					
242	202	211	219	224	184					
255	211	226	233	231	196	163	Bianco	PBS 1X estratto		
219	166	174	178	181	144					
234	162	188	193	174	150					
1793	1105	1220	1249	1199	1191	1160	calibratore	1:8000 anti rabbit(R5506)		
1744	1052	1171	1204	1159	1146					
1754	1052	1165	1197	1140	1142					

VRAK

ch4	ch6	ch8	ch10	ch12	ch10-ch2	media	campione	curva	coating	tracciante
1775	1054	1164	1190	1150	1115	979	calibratore	1:8000 anti rabbit(R5506)	lotto 003/s 15 γ	lotto 005 40γ
1665	776	866	892	858	843					
2512	2085	2145	2211	2210	2127	2127	1Mf	10^6		
2268	367	410	425	408	383	365	-1	10^5		
1250	333	379	392	368	346					
253	205	231	238	230	203	187	-2	10^4		
236	186	198	203	205	171					
209	131	149	156	146	116		-3	3x10^3		
1073	935	1031	1050	1020	1004	1124	calibratore	1:8000 anti rabbit(R5506)		
1331	1169	1266	1290	1248	1243					
267	222	251	261	248	222	182	B			
217	162	173	176	177	142					

	BULK	VRAC
10^6		2127
10^5	2108	365
10^4	450	187
10^3	172	116
10^2	180	



Curva: 1Mf in PBS 1X. Sono state effettuate diluizioni seriali. E'stato seminato il punto -3 su terreno agar sabouraud. Sono stati estratti tutti i punti della curva con una soluzione estraente di HNO_2 (sviluppato in ambiente di reazione per reazione tra Sodio Nitrito-R_1- e Acido Acetico-R_2-) e soluzione neutralizzante di Ammonio Carbonato-R_3-, prima dell' effettuazione del test. L'estrazione avviene nei seguenti rapporti dei reazione: 100µl di sospensione + 125 µl di R_1 +125µl di R_2 +250µl di R_3.

Chorus: 1155

Calibratore: 1:8000 antirabbit (R5506) in diluent 2

Sensibilità tra 10^5-10^4 (vrac) 10^4-10^3 (bulk)

2. PROVA DI PRECISIONE

La prova di precisione è stata effettuata ripetendo 6 volte il calibratore di ciascun kit. I calibratori sono stati preparati utilizzando anticorpi diluiti in diluent2 al fine di ottenere un valore intorno a 1000 digit, di seguito i risultati:

ch2	ch4	ch6	ch8	ch10	ch12	ch12-ch2	media	DS	CV	calibratore	KIT
38	452	691	816	894	939	901	969	216	22,29	1:30000 antimause(9637)	gardnerella (tracciante004 15γ coating004 20γ)
38	509	788	917	999	1058	1020					
45	447	638	756	820	837	792					
46	521	777	917	1008	1048	1002					
47	408	603	703	763	796	749					
51	677	1053	1211	1328	1401	1350					
44	618	881	940	957	951	907	960,33	139	14,47	1:8000 antirabbit (R5506)	candida (tracciante 003 15γ coating005 40γ)
51	521	713	793	806	775	724					
44	658	931	998	1018	996	952					
60	795	1100	1218	1235	1193	1133					
53	714	1001	1102	1116	1084	1031					
48	698	988	1065	1082	1063	1015					
42	501	775	913	999	1048	1006	947,17	136	14,34	1:6400 antirabbit (R5506)	strepto(tracciante010 3γ coating001 20γ)
41	414	650	779	857	906	865					
41	382	605	719	795	837	796					
43	478	744	885	974	1028	985					
39	423	658	779	857	899	860					
50	556	875	1049	1165	1221	1171					

Commento: il valore del coefficiente di variazione è troppo elevato, quindi è stata ripetuta la prova sui kit per Candida e Streptococco su un campione con un valore intorno a 1000, di seguito i risultati ottenuti:

TEST DI PRECISIONE											
ch2	ch4	ch6	ch8	ch10	ch12	ch12-ch2	media	DS	CV	CAMPIONE	KIT
39	150	211	240	261	269	230	180	71	40	bianco(eugon broth)	
34	101	130	153	164	163	129				estratto	
39	435	661	760	825	865	826	994	115	11,6	estratto il punto -2 della curva a partire da 1Mf incubata a 37°C per 2h	strepto
41	503	772	907	994	1033	992					
47	546	827	973	1076	1111	1064					
45	481	724	841	922	950	905					
43	511	816	969	1087	1153	1110					
45	493	746	893	994	1028	983					
44	469	734	883	986	1037	993					
38	478	746	873	969	1023	985					
40	407	638	768	860	905	865					
46	582	905	1082	1197	1259	1213					
47	139	176	206	214	201	154	178	33	19	bianco(PBS)	
41	162	219	244	247	242	201				estratto	
45	385	535	575	583	570	525	575	51	8,9	estratta la diluizione 1:5 di 1Mf *	candida
53	415	567	627	642	615	562					
50	420	580	640	655	628	578					
55	416	567	638	657	622	567					
52	463	636	698	711	684	632					
46	365	512	548	557	549	503					
45	471	651	698	704	688	643					
54	446	610	685	700	667	613					
58	451	619	694	716	676	618					
45	367	512	561	573	554	509					
										*Abs=0.08 a 650nm	

Commento= CV accettabile.

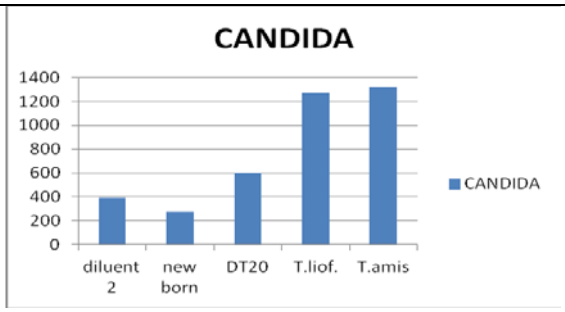
Dato che, utilizzando i calibratori, sono stati ottenuiti dei valori di CV a limite di cut off o troppo elevati(Gardnerella), è stato deciso di cambiare la preparazione dei calibratori.

3.Verifica di funzionalità CALIBRATORI

Candida

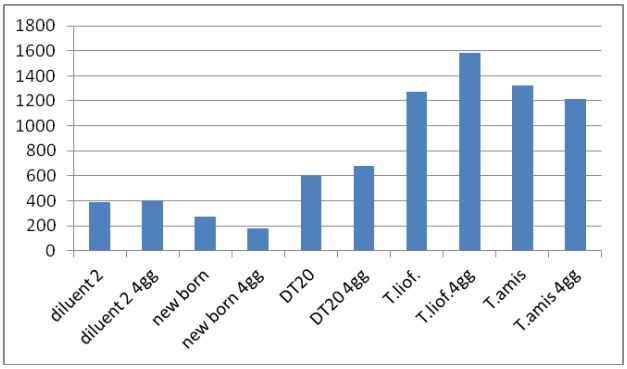
Preparazione calibratore:

E' stata raccolta la patina batterica e risospesa 3 volte in PBS sterile dopo centrifugazione (3000g per 10 min). Una volta ottenuta una concentrazione pari a 1Mf, è stato estratta la sospensione batterica con R1R2R3 in rapporto 1:6. L'estratto è stato diluito 1:5 in PBS ed è stato ottenuto, su chorus, un valore pari a 416 digit. Dato che, il valore, che si voleva ottenere, sarebbe dovuto essere intorno a 1000 è stato deciso di diluire l'estratto 1:2 in vari tamponi stabilizzanti quali: diluent 2, new born, DT20, Tampone liofilo, Terreno amis ottenendo i seguenti risultati:



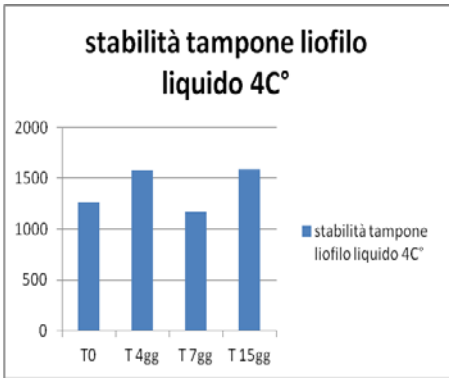
Commento: Con il tampone liofilo e il terreno amis è stato ottenuto il valore desiderato.

Di seguito la tabella di valori a confronto dopo 4 giorni (campioni conservati a 4°C):



Il valore desiderato viene mantenuto dopo 4 giorni con il tampone liofilo e terreno amis. E' stato deciso di liofilizzare il calibratore fatto in tampone di liofilizzazione e continuare la prova di stabilità su tutti gli altri calibratori.

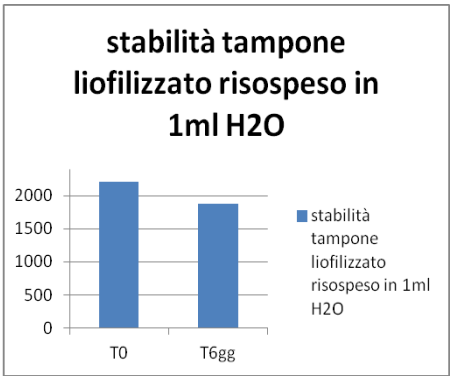
E' stata posta particolare attenzione sul calibratore diluito in Tampone liofilo e conservato a 4°C.Come riportato nella tabella di seguito, la stabilità viene mantenuta fino a 15giorni.



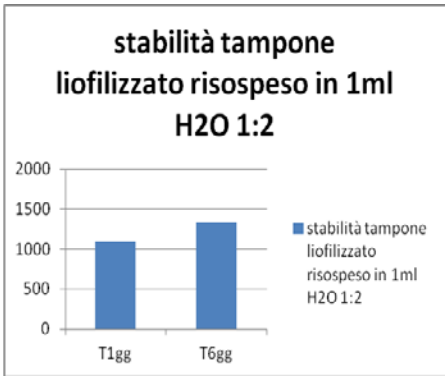
Sono stati liofilizzati 10ml del calibratore praparato nel tampone di liofilizzazione e i restanti 10 ml sono stati mantenuti come tali e conservati a 4°C.

La liofilizzazione è stata effuattuata in boccettini di vetro contenenti 1 ml di soluzione ciascuno, ottenendo così 10 boccettini dei quali 5 sono stati conservati a T.A. e 5 a 4°C.

Nella tabella di seguito sono riportati i risultati del controllo risospeso in 1 ml di acqua a tempo 0 e dopo 6 giorni conservato a temperatura ambiente.



Dato che il valore del calibratore a T0 risulta troppo elevato è stato deciso di rifare la prova partendo dallo stesso campione ma diluito 1:2 in PBS:

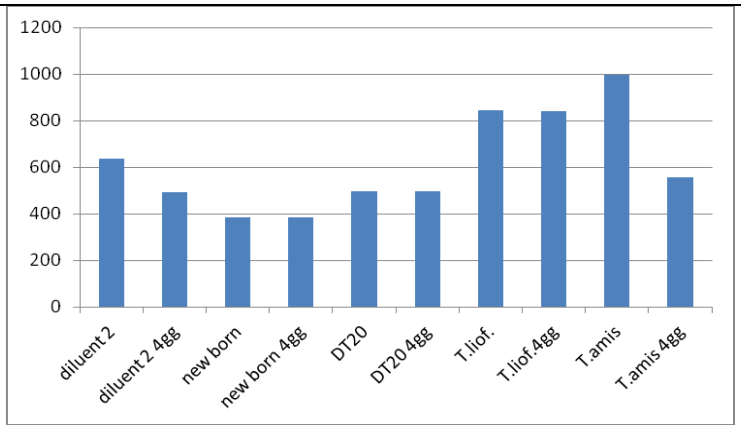


I valori sono accettabili sia dopo 1 giorno che dopo 6 giorni.

Streptococcus agalactiae

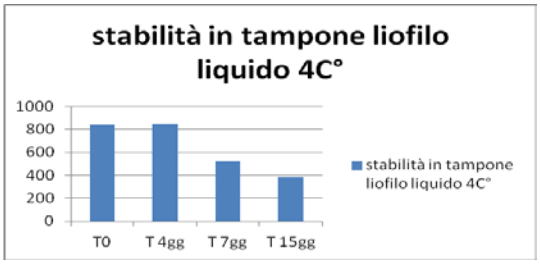
La preparazione del campione è stata effettuata con la stessa procedura utilizzata per il calibratore del kit Candida, in questo caso, però, il rapporto di diluizione, al fine di ottenere un valore intorno a 1000, è 1:4.

I risultati ottenuti con i vari tamponi stabilizzanti, sono riportati nella tabella sotto e sono confrontati con i risultati ottenuti dopo 4 giorni:



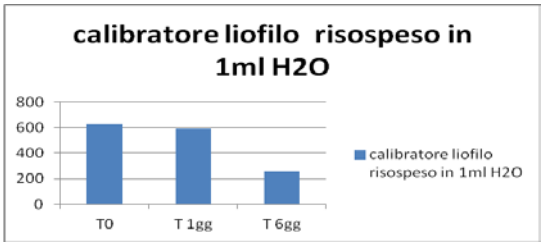
Anche in questo, caso i migliori risultati sono stati ottenuti con il tampone liofilo.

E'stata effettuata la stabilità a 1, 7, 15 giorni del calibratore nel tampone liofilo liquido conservato a 4°C, i risultati sono riportati nella tabella sotto:



E'stato osservato un decremento del segnale con una perdita di 244 digit.

E' stato deciso di procedere con la liofilizzazione, sono stati preparati 20 boccini di vetro da 1 ml di campione (sono stati conservati 10boccini a T.A e 10 a 4°C). Nella tabella di seguito sono riportati i risultati del campione liofilizzazto e risospeso in 1 ml di acqua a tempo 0 e dopo 1 e 6 giorni(conservato a temperatura ambiente):



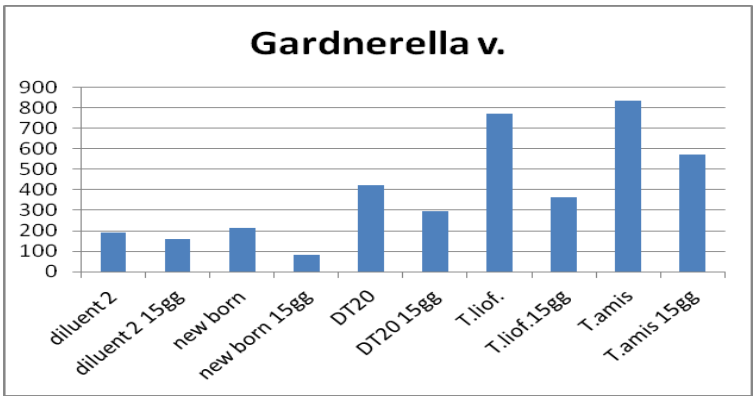
Dopo la liofilizzazione ho perso 400 digit di segnale a tempo zero e il segnale diminuisce dopo sei giorni . Bisogna partire da una concentrazione di campione iniziale più alta, ma il segnale a T0 è accettabile.

Gardnerella vaginalis

La preparazione del campione è stata effettuata con la stessa procedura utilizzata per il calibratore del kit Candida e Streptococco, in questo caso, però, il rapporto di diluizione, al fine di ottenere un valore intorno a 1000, è 1:4.

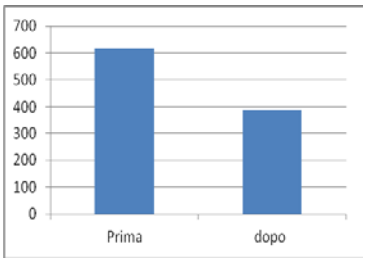
I risultati ottenuti, con i vari tamponi stabilizzanti, conservati a 4°C, a tempo zero e 15

giorni, sono riportati nella tabella sotto:



Anche in questo caso, i risultati accetabili sono quelli in tampone liofilo e terreno amis a tempo zero. Dopo 15 giorni il segnale decresce.

E' stato deciso di procedere alla liofilizzazione. Di seguito i risultati prima e dopo la liofilizzazione:



E' stato osservava una perdita di 232 digit. E' stato deciso di partire da una concentrazione iniziale di campione più alta. Inoltre, bisogna verificare la stabilità nel tempo.

Conclusione:

Dai dati ottenuti è possibile stabilire che

a) per la Candida, si può utilizzare un calibratore preparato in tampone liofilo o in terreno amis o DT20 anche se per quest'ultimo il valore di riferimento si dimezza. E' possibile anche utilizzare un calibratore liofilizzato risospeso in acqua con una stabilità fino a sei giorni.
b) Per lo Streptococco agalactiae si osserva una perdita del segnale a 15 giorni in tampone liofilo liquido, per questo è consigliabile utilizzare un calibratore liofilizzato e risospeso al momento d'uso.
c) Per la Gardnerella vaginalis è stato ottenuto un valore accettabile con il tampone liofilo liquido e terreno amis analizzati a tempo zero. Il campione è stato liofilizzato e verranno in seguito effettuate le prove di stabilità.

N.B= Per ciascun antigene, i calibratori liofilizzati, sono stati conservati metà a 4°c e metà a temperatura ambiente; i calibratori conservati a T.A. dopo 15 giorni risultano in parte sciolti, quindi obbligatoriamente andranno conservati in frigorifero. E' stato inoltre pensato di liofilizzare con la macchina presente nella sede aziendale in località Tognazia, dato che, le prove, sono state effettuate con il liofilizzatore della Toscana biomarker, che non

congela in modo autonomo, ma i campioni sono stati congelati in azoto liquido, ogni ora, per due giorni.

La sperimentazione è tuttora in corso presso il laboratorio della sezione di Microbiologia della Università degli Studi di Siena - Dipartimento di Biotecnologie Mediche, con sede in Siena, (All.1). , Il Laboratorio di Analisi Cliniche dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Ospedali Riuniti Umberto I Ancona e in allestimento da parte di un nostro distributore MEDICLIM presso Laboratori di analisi di nostri clienti (Romania).

Strumenti/attrezzature

Indicare quali sono stati gli strumenti e le attrezzature utilizzati per la realizzazione delle attività.

Strumenti e attrezzature sono già disponibili presso il capofila e comprendono:

-Stabulario per trattamento e manipolazione animali;

-Cappe a flusso laminare verticale, incubatore a CO2, microscopio invertito, frigoriferi+2/8°C, congelatore -30°C, centrifuga refrigerata da banco, bagnomaria, congelatore -80°C, contenitore criobiologico;

-Lavatore e lettore per piastre microtiter, spettrofotometro, incubatore termostato;

-Incubatore termostatato per colture batteriche, microscopio ottico e a fluorescenza;

-Equipaggiamento completo per immunoelettroforesi;

-Sistema cromatografico automatico Ackta-Prime;

-Ph-metro, agitatore magnetico.

Risorse umane

Indicare la percentuale di utilizzo delle risorse umane rispetto a quanto previsto.

PARTNER 1

Dirigenti: 100%

Ricercatore: 100%

Personale Tecnico Qualificato: 100%

Co.Co.Pro (* come da variante approvata del 23/05/2012): 100%

Subcontratti

Non necessari

Risultati raggiunti

Descrivere i risultati raggiunti e i punti cardine (*milestones*) di sviluppo nell'attuazione delle attività. Descrivere in maniera puntuale le eventuali difformità fra i risultati attesi e i risultati conseguiti scientificamente e tecnicamente e proporre le conseguenti azioni correttive.

I risultati raggiunti per questo obiettivo operativo sono tutti quelli precedentemente indicati come attesi, ovvero:

1) Selezione e individuazione di anticorpi monoclonali e/o policlonali ad alta affinità e specificità per i biomarcatori.
2) Verifica della loro funzionalità in un sistema ELISA dopo insolubilizzazione o coniugazione con enzimi.
3) Verifica di fattibilità e sviluppo di kit industrializzabili.
4) Verifica di efficienza dei kit nella diagnosi diretta di infezione.
Come da paragrafo precedente si evince la capacità di produrre kit diagnostici in grado di passare alla successiva fase di applicazione automatica dei metodi.
5) Verifica di applicazione del metodo in automazione.
Inizio previsto nel primo anno ma leggermente posticipato poiché dipende dai risultati della sperimentazione interna della versione manuale del kit. La sperimentazione interna è in leggero ritardo a causa della difficoltà di applicarla sui tamponi vaginali che sono difficilmente reperibili. Attualmente il problema è risolto avendo preso accordi con un Laboratorio Analisi esterno per la fornitura dei tamponi stessi. L'applicazione dei kit in automazione è quindi spostata al secondo anno in base al nuovo cronoprogramma.

Costi sostenuti

Indicare i costi sostenuti da ciascun partner per lo svolgimento dell'obiettivo operativo.

PARTNER 1

€ 1.030.716,76

(*) In caso di variante progettuale autorizzata, si deve fare riferimento al nuovo piano finanziario e al nuovo cronoprogramma approvato.

Obiettivo operativo 3

Realizzazione di un preparatore automatico per il campione urinario destinato allo screening microbiologico

Attività realizzate

Illustrare le attività realizzate specificando il ruolo di ciascun partner del progetto.

Tutte le attività di questo obiettivo sono di competenza del solo partner capofila **Diesse Ricerche Srl.**

ATTIVITA' 1: Studio del contenitore per esame

Il contenitore in studio in questa attività è costituito da una provetta vuota,chiusa, sterile e dotata di un codice a barre univoco.

Tale contenitore deve accogliere una aliquota di terreno di crescita ed una aliquota di campione da esaminare (procedura eseguita da un preparatore automatico oggetto di questo obiettivo operativo), successivamente deve essere utilizzato per lo screening (procedura eseguita da un analizzatore oggetto dell'obiettivo operativo 4), ed infine inserito in un seminatore automatico per l'isolamento ed identificazione (oggetto dell'obiettivo operativo 5).

Questa attività è stata completamente eseguita e conclusa e la ricerca si è articolata nelle fasi di:

[a] Partenza da uno stampo pilota di una provetta già in commercio distribuita da Diesse Diagnostica Senese Spa per l'uso nello strumento Robobact.

La ragione di questo risiede nel fatto che una provetta così realizzata può supportare dal punto di vista delle dimensioni fisiche e della forma, tutte le caratteristiche richieste sopra elencate.

[b] Studio di diversi materiali come a es. metacrilato e polistirolo in funzione della loro compatibilità alle fasi di:

- Sterilizzazione con raggi beta e/o gamma

A tal proposito per esempio è emerso che il metacrilato se sottoposto ad irradiazione con raggi gamma può determinare l'emissione di un monomero che può alterare la misura

della CO2 presente in un campione, determinando falsi livelli aspecifici. Il polistirolo, materiale tra l'altro meno costoso, non sembra essere affetto da questo tipo di problema.

- Facilità di rottura finale per imbibire l'ansa di semina del seminatore automatico a fine ciclo

Questa caratteristica giustifica la scelta di uno stampo già preesistente studiato proprio per questa specifica.

Qui è stata valutata la possibilità di modificare lo spessore del materiale per non incorrere in problemi di estrema fragilità che potrebbero comprometterne il normale uso e trasporto.

- Superficie utile per l'applicazione di un codice a barre univoco che comunque permanga anche dopo la rottura finale del contenitore stesso

Questa caratteristica giustifica la scelta di uno stampo già preesistente studiato proprio per questa specifica, anche se rende di non facile realizzazione una etichetta con codice a barre abbastanza piccola.

- Possibilità di essere chiusa con tappi di gomma

Questa caratteristica giustifica la scelta di uno stampo già preesistente studiato proprio per questa specifica; sia il metacrilato che il polistirolo soddisfano questa esigenza.

- Tenuta a moderate pressioni interne di gas

Questa caratteristica giustifica la scelta di uno stampo già preesistente studiato proprio per questa specifica; sia il metacrilato che il polistirolo soddisfano questa esigenza.

[c] Studio e realizzazione di un tappo in gomma in funzione della compatibilità alle fasi di:

- Sterilizzazione con raggi beta e/o gamma

- Pluri perforabilità da parte del preparatore ed analizzatore senza compromissione della tenuta alla fuoriuscita di gas

- Non permanenza di liquido per tensione superficiale la di sotto del tappo stesso in caso di capovolgimento della provetta

Tappo vista Laterale

Tappo vista Superiore

Tappo vista

Inferiore

Provetta Completa di tappo e codice a barre univoco

NOTA : è stato anche studiato un tappo per l'immissione manuale del solo campione

vista laterale **vista superiore** **vista inferiore**

provetta per infialamento manuale con tappo apribile e codice a barre univoco

Come si vedrà di seguito, per i laboratori di analisi dove non è giustificato il costo di un preparatore automatico a causa del ridotto numero di esami il giorno, si è pensato di fornire provette già contenenti terreno e dotate di un particolare tappo in gomma che permette l'infialamento manuale di una aliquota di campione urinario attraverso un piccolo setto che si richiude automaticamente.

ATTIVITA' 2: Adattabilità alle varie tipologie di contenitori in ingresso

Una caratteristica importante del preparatore è quella di poter accettare tutti i possibili contenitori di campioni che afferiscono al laboratorio.

Il campione urinario può essere contenuto in una provetta o in un barattolo, considerando che, a seconda di ogni tipologia, ci sono sottocategorie di formati. Poiché lo scopo principale del preparatore è quello di evitare che l'operatore manipoli il campione biologico per renderlo disponibile alle successive fasi analitiche, è importante che la stazione

automatica che agisce per suo conto, sia in grado di accettare ogni tipo di flacone in ingresso.

Nello sviluppo di questa attività sono state vagliate diverse ipotesi, alcune delle quali studiate su simulazioni.

Questa attività è stata completamente eseguita e conclusa.

Riassumendo si è deciso di studiare e realizzare un modello che abbia le seguenti caratteristiche:

[a] Accettazione di contenitori multiformato

La miglior soluzione per permettere allo strumento di accettare una pluralità di contenitori diversi, senza per questo apportare modifiche o adattamenti meccanici, è quella di utilizzare dei rack porta campioni che abbiano dimensioni esterne come altezza, lunghezza e profondità identiche; quello che cambia è il numero e la dimensione degli alloggiamenti dei contenitori all'interno di ciascun rack.

In questo modo si possono introdurre a piacere sia provette che barattoli utilizzando il rack specifico, che tra l'altro è dotato di un codice a barre specifico per permettere al preparatore di capire quale tipologia deve essere lavorata.

Sono stai quindi realizzati rack porta provette da 80 posizioni e rack per barattoli da 12 posizioni.

[b] Metodologia di riconoscimento del codice a barre paziente

Il preparatore deve poter leggere il codice a barre del campione urinario per tre motivi fondamentali:

1_ eseguire una procedura di check-in, ovvero comunicare al server centrale del laboratorio l'effettivo arrivo del campione in laboratorio;

2_ accoppiare il codice del paziente a quello della provetta di analisi, per non perdere la tracciabilità;

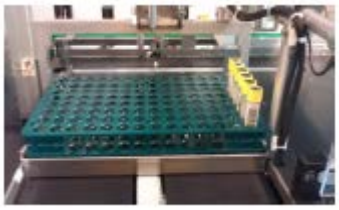
3_ accoppiare il campione alle coordinate che identificano la sua esatta posizione nel rack che lo contiene.

Anche in questo caso per evitare adattamenti meccanici si è optato per:

1_ Introduzione di un braccio robotico che in presenza di provette, le estrae dal rack, le posiziona davanti ad un lettore di codici a barre, le mette in rotazione sino all'acquisizione del codice stesso per poi riposizionarle nel rack.

2_ Nel caso dei barattoli c'e' un lettore di codice a barre mobile che legge il codice di ciascun campione dall'alto, essendo esso applicato sul coperchio del contenitore.

esempio di provetta per urina



rack adattore per provetta urina

esempio di barattolo per urina

rack adattore per barattolo urina

[c] Prelievo aliquota di campione

Terzo aspetto fondamentale della compatibilità multiformato del campione in ingresso è il prelievo di una aliquota di campione. La prima strada valutata è stata quella di aprire e richiudere automaticamente ogni contenitore, ma la multivarietà degli stessi rendeva complicata la soluzione meccanica sia dal punto di vista progettuale che il successivo aggravio di costi sullo strumento finale.

La soluzione scelta è stata quella di prelevare una aliquota di campione mediante un microforo (piercing) praticato sul tappo del contenitore, sia esso in gomma o plastica, da un apposito ago di acciaio.

È stato quindi progettato un ago di acciaio con le seguenti caratteristiche:

1_ punta e resistenza adatta a perforare qualsiasi tipo di tappo o coperchio presente sui flaconi;

2_ punta molto fine per ridurre al massimo il diametro del foro;

3_ ampio serbatoio in modo da accettare fino ad 1,5 ml di campione;

4_ possibilità di collegamento ad un sensore di livello capacitivo per evitare l'immersione completa dell'ago stesso dentro ogni campione (per evitare carry over);

5_ presenza di un sistema di sfiato per evitare contropressioni dovute alla successiva fase di dispensazione dell'aliquota di campione in provetta chiusa contenente terreno;

6_ compatibilità con la fase di sanitizzazione con soluzioni disinfettanti tra un campione urinario ed il successivo (per evitare carry over).

Esempio di provette e piercing:

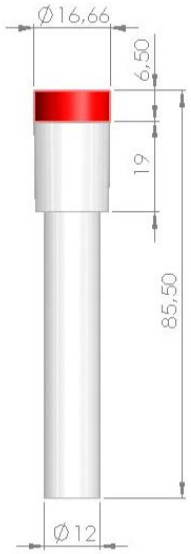


Figura 1: Provetta vuota

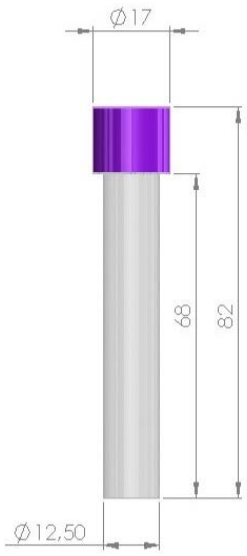


Figura 2: Campione biologico

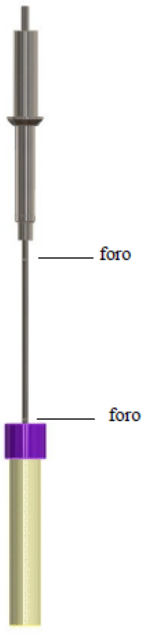


Figura 4: Campione in quantità massima

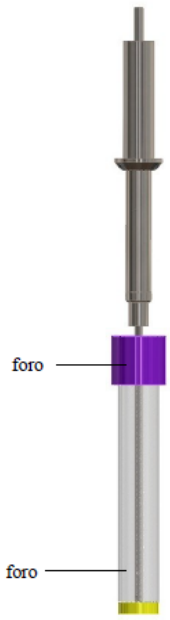


Figura 5: Campione in quantità minima

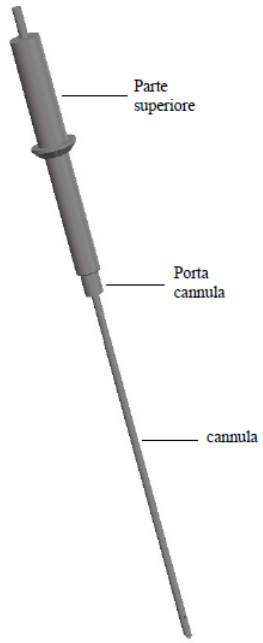


Figura 7: Ago aspirazione/dispensazione campioni

Figura 12: Parte superiore dell'ago in trasparenza

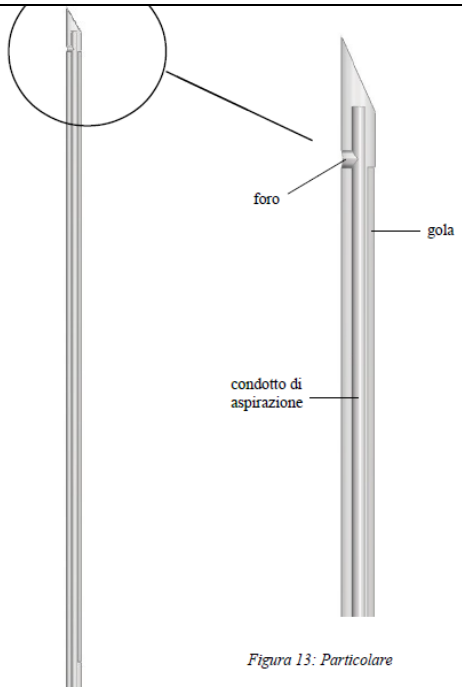


Figura 13: Particolare

ATTIVITA' 3: Meccanica dello strumento

Dopo aver messo a punto i materiali di base relativi all'attività precedente (2) si è proceduto alla progettazione e realizzazione della meccanica dello strumento preparatore.

Questa attività è stata completamente eseguita e conclusa e la ricerca si è articolata nelle fasi di:

[a] Studio di un rack porta provette per successiva analisi compatibile con lo strumento analizzatore oggetto dell'obiettivo operativo 4.

[b] Studio del buffer di carico dei porta-provette per successiva analisi compatibile con lo strumento analizzatore: **RACK IN.**

[c] Studio del buffer di scarico dei porta-provette per successiva analisi compatibile con lo strumento analizzatore: oggetto **RACK OUT.**

[c] Studio del trasferitore dei porta-provette dal buffer di carico a quello di scarico.

[e] Studio del buffer di carico dei campioni urinari: **SAMPLE IN.**

[f] Studio del buffer di carico dei campioni urinari: **SAMPLE OUT.**

[g] Studio del gruppo per infialamento terreno.

ATTIVITA' 4: Studio dei contenitori e terreni da infialare e test biochimici di base

Questa attività è stata completamente eseguita e conclusa.

Poiché lo strumento preparatore deve infialare in provette vuote e sterili sia una aliquota di campione urinario che di terreno di crescita, sono state studiate varie possibilità e varietà di contenitori per contenere un volume di terreno di coltura tale da permettere la preparazione di circa 200 campioni al giorno o 100 campioni per due giorni.

La scelta è stata di utilizzare sacche da flebo da 250 ml che vengono infialate con terreno, sterilizzate ed etichettate.

Poi tramite un attacco speciale demoninato “Luer Lock“ vengono applicate al gruppo dispensatore il terreno del preparatore.

Poiché il preparatore utilizza del disinfettante (ALCOSAN VT 10) sia durante il ciclo onde evitare fenomeni di carry over, sia a fine ciclo per la sanitizzazione finale, sono sati scelti :

- sacca per sanitizzazione finale da sostituire a quella del terreno ;

- tanica per sanitizzazione in ciclo .

Il tipo di terreno utilizzato consiste in un “brodo eugonico“ doppio concentrato “EUGON BROTH 2X”, perché ha la caratteristica di fornire un ambiente di crescita compatibile con tutti i germi che si possono trovare nelle urine in caso di infezione.

Ovviamente su questo terreno sono stati eseguiti tutti i test biochimici di base ed in aggiunta predisposti dei controlli sulla sterilità, fertilità e scadenza del prodotto una volta infialato.

ATTIVITA' 5: Associazione univoca del campione

Questa attività è stata completamente eseguita e conclusa.

Il campione di urina da analizzare arriva in un contenitore (provetta e/o barattolo) al quale viene applicata una etichetta barcode per l'identificazione del paziente e poiché il preparatore trasferisce una aliquota di questa in una provetta per l'analizzatore, è necessario che quest'ultima sia dotata di un codice a barre univoco per permettere l'associazione univoca tra barcode paziente e barcode provetta analizzatore.

provetta

barattolo

Provetta Completa di tappo e codice a barre univoco

Questa procedura è stata applicata utilizzando strumenti software già descritti in un brevetto DIESSE chiamato IdSystem.

ATTIVITA' 6: Validazione sterilità ed eventuale carry over piu' report e manualistica

Questa attività eseguita e completamente conclusa.

VALIDAZIONE STERILITA'

Da numerose prove eseguite è emerso che nel preparatore c'è assenza di inquinamento.

VERIFICA CARRY OVER

Da prove eseguite risultano assenti significativi fenomeni di Carry Over.

Analizzando i cicli analitici dei Laboratori degli ospedali di Novi Ligure che di Pievesestina (FC) si dimostra chiaramente che nono sussiste un carry over funzionale nel senso che :" il nostro sistema diagnostico é in grado di distinguere un campione (leggi paziente) positivo (leggi ammalato) da un negativo (leggi sano)

REPORT E MANUALISTICA

Il preparatore viene al momento fornito di:

1_ Prima versione di manuale utente: QUICK START

2_ Schede tecniche reagenti e consumabili (provette)

3_ Schede tecniche relative alla descrizione del sistema e delle norme di buona fabbricazione utilizzate.

La fase non è completata perché sono in corso:

1_ Prove per la certificazione CE;

IL sistema plus Finder ++ inteso come Analizzatore e Preparatore è stato sottoposto a Certiificazione CE come visibile dai documenti allegati .

EC DECLARATION OF CONFORMITY

In accordance with 98/79/EEC regulation regarding In-Vitro Medical Diagnostics Devices

DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.

DIESSE DIAGNOSTICA SENESE S.p.A. with head office in Milan, Via A. Solari 19 sc. 6

certifies

that the design, type of manufacture of the in vitro medical-diagnostics device described hereafter and the version distributed on the market,

conforms

to the

"98/79/EEC directive relevant to the In Vitro Medical-Diagnostics Devices (IVD)"

through the accomplishment to the Annex III (except section 6) and the essential requirements of Annex I.

This certificate will lose its validity in the event of:

- unauthorised modifications are made to the unit
- incorrect use of the instrument
- technical interventions performed by unauthorized personnel
- installation of non-original spare parts.

Product:	**Automatic instrument for screening test of bacteriuria**
Type:	**PLUS FINDER ++ ANALYZER**
Technical data:	**110-120/230 Vac (56–60 Hz)**

conforms

as a whole and in its parts, with the following standards and their amendments:

EN 61010-1 **"Safety requirements for electrical equipment for measurement, control and laboratory use – Part 1: General requirements ".**

EN 61326-1 **"Electrical Equipment for Measurement, Control, and Laboratory Use – Electromagnetic compatibility requirements–Part 1: General requirements"**

EN 61326-2-6 "Electrical Equipment for Measurement, Control, and Laboratory Use – Electromagnetic compatibility requirements–Part 2-6: In vitro diagnostic (IVD) medical equipment"

And therefore meets the minimum requirements of the following Community directives and their amendments:

Low Voltage Directive (2006/95/EEC)

Electromagnetic Compatibility Directive (2004/108/EEC)

Place, date of issue: Monteriggioni, 15 September 2014

Signature:

Francesco Cocola

General Manager

EC DECLARATION OF CONFORMITY

In accordance with 98/79/EEC regulation regarding In-Vitro Medical Diagnostics Devices

DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.

DIESSE DIAGNOSTICA SENESE S.p.A. with head office in Milan, Via A. Solari 19 sc. 6

certifies

that the design, type of manufacture of the in vitro medical-diagnostics device described hereafter and the version distributed on the market,

conforms

to the

"98/79/EEC directive relevant to the In Vitro Medical-Diagnostics Devices (IVD)"

through the accomplishment to the Annex III (except section 6) and the essential requirements of Annex I.

This certificate will lose its validity in the event of:

- unauthorised modifications are made to the unit
- incorrect use of the instrument
- technical interventions performed by unauthorized personnel
- installation of non-original spare parts.

Product: **Automatic instrument for preparation of the screening test of bacteriuria**

Type: **PLUS FINDER ++ PREPARATOR**

Technical data: **110-120/230 Vac (56–60 Hz)**

conforms

as a whole and in its parts, with the following standards and their amendments:

EN 61010-1 **"Safety requirements for electrical equipment for measurement, control and laboratory use – Part 1: General requirements ".**

EN 61326-1 **"Electrical Equipment for Measurement, Control, and Laboratory Use – Electromagnetic compatibility requirements–Part 1: General requirements"**

EN 61326-2-6 **"Electrical Equipment for Measurement, Control, and Laboratory Use – Electromagnetic compatibility requirements–Part 2-6: In vitro diagnostic (IVD) medical equipment"**

And therefore meets the minimum requirements of the following Community directives and their amendments:

Low Voltage Directive (2006/95/EEC)

Electromagnetic Compatibility Directive (2004/108/EEC)

Place, date of issue: Monteriggioni, 15 September 2014

Signature: F. Cocola

Francesco Cocola

General Manager

2_ stesura manuali di "service".

I manuali di service per l'assistenza tecnica sono stati redatti .

Indicare quali sono stati gli strumenti e le attrezzature utilizzati per la realizzazione delle attività.

Strumenti e attrezzature sono già disponibili presso il capofila e comprendono:

1. Strumentazione per lo sviluppo di prototipi meccanici e relativo software;
2. Strumenti del laboratorio di microbiologia (es. cappa biohazard, autoclave, vetreria, congelatori, ecc.).
3. Le prove per le Certiificazione CE sono state eseguite direttamente presso i Laboratori di ANALYTICAL CE.TA.CE a SCANDICCI (Firenze)

Risorse umane

Indicare la percentuale di utilizzo delle risorse umane rispetto a quanto previsto.

PARTNER 1

Ricercatore: 100%

Personale Tecnico Qualificato: 100%

Co.Co.Pro:(* come da variante approvata del 23/05/2012) 100%

Subcontratti

Contratto di consulenza con FVM.

Risultati raggiunti

Descrivere i risultati raggiunti e i punti cardine (*milestones*) di sviluppo nell'attuazione delle attività. Descrivere in maniera puntuale le eventuali difformità fra i risultati attesi e i risultati conseguiti scientificamente e tecnicamente e proporre le conseguenti azioni correttive.

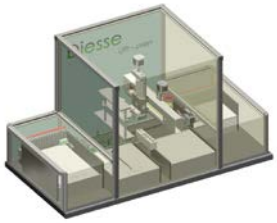
I risultati raggiunti per questo obiettivo operativo sono tutti quelli precedentemente indicati come attesi, ovvero:

1) Strumento in grado di accettare una varietà di contenitori di urine in ingresso;
2) Provetta unica per le successive analisi;
3) Contenitore sterile per il bulk di terreno con circuito infilatore disponibile;
4) Sistema di sanitizzazione;
5) Assenza di Carry Over (momento decisivo);
6) Assenza di inquinamento (momento decisivo);
7) Sistema antierrore di identificazione codice campione;
8) Produttività non inferiore allo strumento dello screening.

Non ci sono state difformità tra i risultati attesi e quelli ottenuti.

L'obiettivo ha inoltre permesso la realizzazione di un vero e proprio prodotto commerciale denominato: PlusFinder++ Preparatore.

Il prodotto è stato ufficialmente presentato al mercato italiano da Diesse Diagnostica Senese Spa in occasione del XLI congresso AMCLI a Rimini nel Novembre 2012 -2013 e 2014 e alla mostra Internazionel Medica (Germania) nel Novembre 2013 e 2014 (codice vendita 94804).



Costi sostenuti

Indicare i costi sostenuti da ciascun partner per lo svolgimento dell'obiettivo operativo.

PARTNER 1

€ 265.041,45

(*) In caso di variante progettuale autorizzata, si deve fare riferimento al nuovo piano finanziario e al nuovo cronoprogramma approvato.

Obiettivo operativo 4

Realizzazione di uno strumento per lo screening microbiologico delle urine e anche per il successivo antibiogramma.

Attività realizzate

Illustrare le attività realizzate specificando il ruolo di ciascun partner del progetto

Tutte le attività di questo obiettivo sono di competenza del solo partner capofila **Diesse Ricerche Srl.**

ATTIVITA' 1: Studio sensoristica per la detenzione del fenomeno di crescita

Questa attività è stata completamente eseguita e conclusa

L'attività si e concentrata sulla ricerca di mercato di sensori in grado di rilevare e misurare la quantità di CO_2 **(**anidride carbonica) che si sviluppa in una coltura batterica a seguito dell'attività metabolica connessa alla crescita dei batteri stessi.

Le caratteristiche del sensore consistevano in:

1) Velocità di misura della CO_2 presente;
2) Dimensioni ridotte;
3) Stabilità nel tempo;
4) Basso costo.

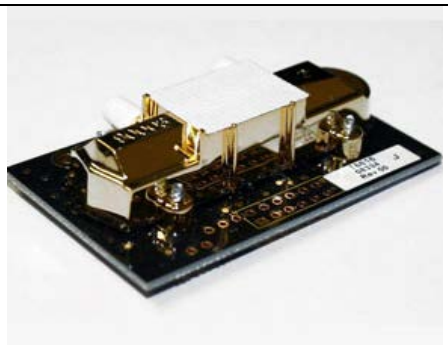
Il sensore è stato reperito sul mercato ed è distribuito dalla General Electric (GE).

Di seguito si riportano le caratteristiche dello stesso.

T6615 CO_2 Module

Compact CO_2 Module Designed to Integrate Into Existing Controls and Equipment

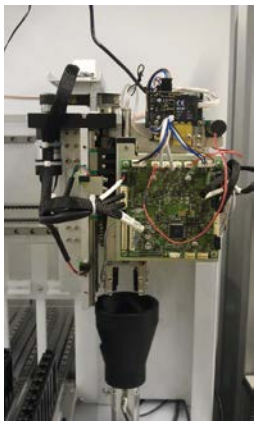
The Telaire T6615 dual-channel CO_2 Module is designed to meet the volume, cost, and delivery expectations of Original Equipment Manufacturers (OEMs). The T6615 is a dual channel sensor. The two channels can be described as a CO_2 channel that measures gas concentration and a reference channel that measures the sensor signal intensity.



Sensore NDIR

Method	Method Dual-channel Non Dispersive Infrared (NDIR), gold plated optics, diffusion or flow through sampling.
Measurement Range	0 to 2000 ppm 0 to 5000 ppm 0 to 10,000 ppm 0 to 50,000 ppm
Dimensions	2.25 in X 1.365 in X 0.60 in (57.15 mm X 34.67 mm X 15.24 mm)
Accuracy*	75 ppm or 10% of reading (whichever is greater)
Temperature Dependence	0.2% FS per °C
Stability over Life of Sensor (10 Years)	< 5% of FS or <10% reading annual
Pressure Dependence	0.135% of reading per mm Hg
Response Time	< 2 minutes for 90% step change typical
Warm Up Time	• < 2 minutes (operational) • 10 minutes (maximum accuracy)
Operating Conditions	32°F to 122°F (0°C to 50°C) 0 to 95% RH, non condensing
Storage Conditions	-40°F to 158°F (-40°C to 60°C) (Non Condensating)

E' stata inoltre progettata e realizzata una scheda di controllo per la gestione dei sensori.



Scheda sensori

ATTIVITA' 2: Studio tempistica del ciclo

Questa attività è stata completamente eseguita e conclusa

Una volta individuato il principio base da applicare, e prima di passare alla progettazione

e realizzazione di un primo prototipo, sono sati fatti studi, simulazioni e primi test del sensore, per capire la tempistica auspicabile e compatibile per uno screening rapido delle batteriurie.

Un aspetto importante e decisivo è stato quello di evitare risposte falso negative, ovvero di refertare come sano un campione infetto.

I risultati sono stati di fissare preliminarmente, per ogni campione, un tempo massimo di 2 ore di analisi; prevedendo un ciclo teorico di questo tipo:

TEMPO 0

- agitazione campione per 3 min
- lettura anidride carbonica basale
- insufflazione di aria fresca nella provetta di coltura
- incubazione per 50-60 min in termostato a 38°C (con miscelazione ogni 12 min)

TEMPO 50-60 min

- lettura anidride carbonica (per eventuale sviluppo)
- insufflazione di aria fresca nella provetta di coltura
- incubazione per 50-60 min in termostato a 38°C (con miscelazione ogni 12 min)

TEMPO 120 MIN

- lettura anidride carbonica FINALE
- risultato

ATTIVITA' 3: Realizzazione di un incubatore

Questa attività è stata completamente eseguita e conclusa

Questa attività, benché completata, ha richiesto notevoli sforzi progettuali a causa della complessità e delle caratteristiche attese dall'incubatore in oggetto.

Per poter essere applicato su uno strumento automatico i requisiti richiesti consistevano in:

1) Velocità di warm up
2) Sistema di ventilazione interno tale da garantire una perfetta omogeneità di calore nell'ambiente

3) Ridotta dispersione di calore durante l'introduzione ed estrazione di campioni
4) Sistema di accesso multiplo per poter inserire pochi campioni alla volta.

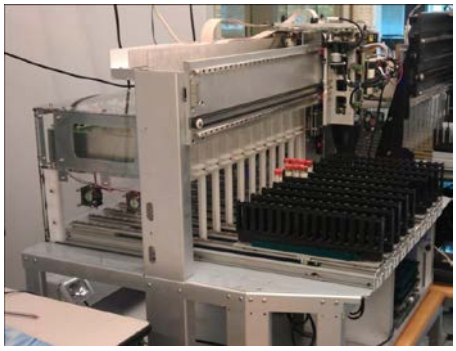
E' stato realizzato quanto segue:

1) Velocità di warm up: 15-20 minuti per raggiungere una temperatura di 39°C.
2) Sistema di ventilazione interno tale da garantire una perfetta omogeneità di calore nell'ambiente:

   - sistema costituito da una serie di ventole distribuite nella parte alta e laterale della camera termostatica.
3) Ridotta dispersione di calore durante l'introduzione ed estrazione di campioni:

   - sistema per accesso su linee separate di 10 rack ciascuno contenente fini a 16 campioni.

   L'accesso di ciascun rack avviene attraverso l'apertura verticale di singole saracinesche di accesso, in modo da evitare dispersioni esterne di calore.
4) Sistema di accesso multiplo per poter inserire pochi campioni alla volta: vedi punto 3.



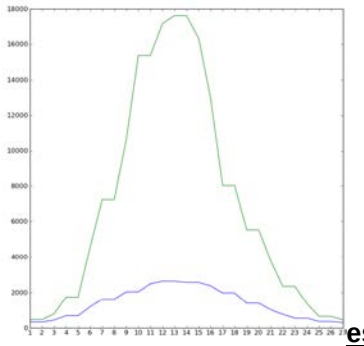
Vista di rack contenenti provette con slitte di accesso al termostato nella parte posteriore dello strumento.

E' stata inoltre progettata e realizzata una scheda di controllo per la termostatazione.

ATTIVITA' 4: Software di controllo per il monitoraggio degli eventi in funzione del tipo di sensore da utilizzare

Questa attività è stata completamente eseguita e conclusa

Studio e realizzazione di algoritmi di elaborazioni dei segnali provenienti dai sensori.



esempio di grafico acquisizione livelli di CO2 da sensore.

ATTIVITA' 5: Sviluppo di terreni adatti alla nuova procedura e di terreni con varie associazioni di antibiotici.

Al momento vengono utilizzati terreni di commercio anche se doppio concentrati: EUGON BROTH 2X (Becton Dickinson).

ATTIVITA' 6: Sperimentazione interna ed esterna (sia su ceppi di collezione che "selvaggi"), report e manualistica.

Sebbene non prevista, questa fase è già iniziata attraverso una valutazione interna ed esterna del prototipo strumentale.

…

Sono state effettuate delle sperimentazioni si interne che esterne come indicato nella tabella riassuntiva ,

Dove	n° Campioni		conservante
Internal	2500	no	Borate
Careggi Florence	2500		Borate
Novi Ligure 1 *	500	no	Borate
Novi Ligure 2	2000		Borate
Cesena	10000		Borate

Come si vede sono state verificate diverse condizioni , compreso il tipo di conservante

con il quale il campione urinario arriva in laboratorio.

Presso il Laboratorio Centralizzato di Pievesestina (Cesena) il sistema è stato anche valutato nel suo comportamento in relazione all'elevato numero di test.

Tutte le prove hanno dato esito positivo ed hanno avuto un giudizio positivo da parte degli utilizzatori .

La novità assoluta del sistema consiste di determinare il risultato analitico utilizzando un Cut OFF Dinamico .

LA positività di un campione non viene valutata semplicemente dai valori di CO2 prodotto ma tiene conto di alcuni dati sensibili del paziente , come es :

sesso

età

reparto di provenienza

tipo di materiale biologico e/o prelievo (es. mitto intermedio o catetere).

Tutto questo significa che a parità di segnale relativo alla produzione di CO2 il sistema , prima di decidere circa la positività di un campione , tiene conto di tutti gli altri parametri sopra descritti , in base ad uno "score " di rischio assegnato .

Questo ne determina una **CARATTERISTICA UNIVOCA RISPETTO A TUTTI GLI ALTRI SISTEMI DI SCREENING PRESENTI SUL MERCATO .**

SOLO A TITOLO DI ES . SI RIPORTANO GLI ALGORITMI DI CUT OFF DINAMICO

++

ES. DI ALGORITMI UTILIZZATI IN PRESENZA DI BORATO COME CONSERVANTE

c1,(T0>=600)and(T1>=T0)and (T2),>=,T1, INC(SEM),ASSENTE,V,M,M
cn1,(T1-T0),>=,1000,POS,ASSENTE,V,M,M
cPAR,(T0<1000) and (T0>T1) and T1 ,>,T2,AMA,ASSENTE,R,M,M
cPAR1,(T0>T1) and T1,>,T2,AMA, ASSENTE,R,M,M
c2,(T0<900) and (T1>1000) and ((T2*100)/T0>120) and (T1*100)/T0,>=,135, LIEVE (SEM),ASSENTE,G,M,M
c3,(T1>2000) and (T2>2000) and ((T2*100)/T1),>,90,LIEVE (SEM),ASSENTE,G,M,M
c4,((T2*100)/T0)>= 140 and (T1*100)/T0 ,>=,180, INC(SEM),ASSENTE,G,M,M
c5,(T1>2000) and (T2>2000) and (T2),>,T0,LIEVE (SEM),ASSENTE,G,M,M
c6,(T1 >=1900) and (T1 <= 2000) and (T0 >=1400) and (T0 <=1500) and (T2 >=1400) and (T2) ,<=,1500, limite,ASSENTE,G,M,M
c7,(T1 >=1900) and (T1 <= 2000) and (T0 >=1300) and (T0 <=1400) and (T2 >=1500) and (T2) ,<=,1700, limite,ASSENTE,G,M,M
c8,T0,<=,400, !RIP,ASSENTE,R,M,M
c9,(T0>1200) and (T0<3000) and (T1>T0) and ((T2*100)/T0<120) and (T1*100)/T0,>=,120, LIEVE (SEM),ASSENTE,G,M,M
end

ES. DI ALGORITMI SENZA CONSERVANTE

algo1,T0,>,3000,ATTIVO,negative,G,F,M
algo2,(T1*100)/T0,>,200, ATTIVO ,ASSENTE,V,F,M
algo3,(T2*100)/T0,>,200, ATTIVO ,ASSENTE,V,F,M
algo4,(T2*100)/T0,>,180, LIEVE,ASSENTE,B,F,M
algo5,(T0+T1+T2),>,2650, DUBBIO,ASSENTE,B,M,M
algo6,(T0+T1+T2),<,1700, ! RIP,ASSENTE,R,M,M
end

Strumenti/attrezzature

Indicare quali sono stati gli strumenti e le attrezzature utilizzati per la realizzazione delle attività.

Strumenti e attrezzature sono già disponibili presso il capofila e comprendono:

1. Strumentazione per lo sviluppo di prototipi meccanici e relativo software;
2. Strumenti del laboratorio di microbiologia (es. cappa biohazard, autoclave, vetreria,

congelatori, ecc.)

3. Strumenti ed attrezzature dei laboratori esterni di sperimentazione

Risorse umane

Indicare la percentuale di utilizzo delle risorse umane rispetto a quanto previsto.

PARTNER 1

Ricercatore: 100%

Personale Tecnico Qualificato: 100%

Co.Co.Pro: (* come da variante approvata del 23/05/2012) 100%

Subcontratti

Contratto di consulenza con Everex Srl

Risultati raggiunti

Descrivere i risultati raggiunti e i punti cardine (*milestones*) di sviluppo nell'attuazione delle attività. Descrivere in maniera puntuale le eventuali difformità fra i risultati attesi e i risultati conseguiti scientificamente e tecnicamente e proporre le conseguenti azioni correttive.

I risultati raggiunti per questo obiettivo operativo sono quelli precedentemente indicati come attesi, ovvero:

1. Strumento dotato di un sensore in grado di monitorare il fenomeno di crescita batterica;

2. Realizzazione meccanica di componenti in grado di eseguire il test secondo la produttività oraria stabilita;

3. Realizzazione di un incubatore capace di raggiungere la temperature adeguata all’interno della provetta tale da garantire la crescita ottimale dei microorganismi;

4. Software di controllo per il monitoraggio degli eventi in funzione del tipo di sensore da utilizzare;

5. Scelta di un unico terreno tale da garantire la crescita di tutte le specie batteriche;

6. Messa a punto di varie composizioni di terreno; per quanto riguarda la scelta di antibiotici per l'esecuzione dell'antibiogramma la fase è ancora in corso.

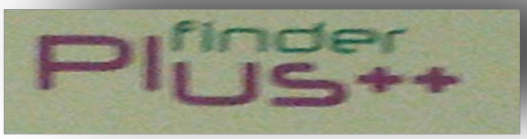
7. La validazione del sistema mediante sperimentazione interna ed esterna è in corso.

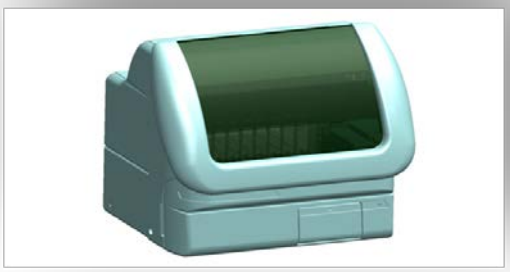
Denominato: PlusFinder++ Analizzatore.

Il prodotto è stato ufficialmente presentato al mercato italiano da Diesse Diagnostica Senese Spa in occasione del XLI congresso AMCLI a Rimini Novembre 2012-2013-2014.

Presentata anche alla mostra Internazionale della medicina , denominata MEDICA che si svolge in Germania nov 2013 e 2014

(codice vendita 94800).





Costi sostenuti
Indicare i costi sostenuti da ciascun partner per lo svolgimento dell'obiettivo operativo. PARTNER 1 € 530.082,90

(*) In caso di variante progettuale autorizzata, si deve fare riferimento al nuovo piano finanziario e al nuovo cronoprogramma approvato.

Obiettivo operativo 5

Realizzazione di uno strumento per isolamento ed identificazione in campioni microbiologici.

Attività realizzate

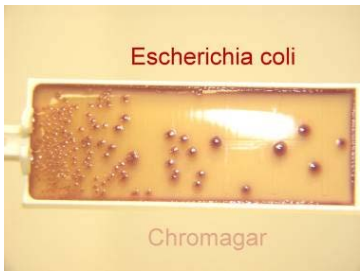
Illustrare le attività realizzate specificando il ruolo di ciascun partner del progetto.

Tutte le attività di questo obiettivo sono di competenza del solo partner capofila **Diesse Ricerche Srl.**

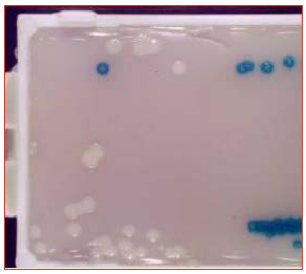
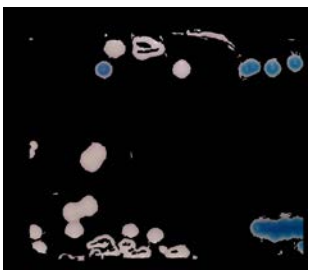
ATTIVITA' 1: Studio di un sistema di riconoscimento colonie su semina effettuata da strumento automatico.

Sono state acquisite delle immagini su dei device seminati con lo strumento Robobact commercializzato da Diesse Diagnostica Senese e su queste sono state avviate delle prove preliminari per l'applicazione di algoritmi di elaborazione di immagini atti ad evidenziare delle caratteristiche (feature) di ogni tipo di colonia batterica sviluppata. Lo scopo è utilizzare queste feature per creare un dataset finalizzato all'addestramento di reti neurali per il riconoscimento delle colonie.

seminatore automatico Diesse



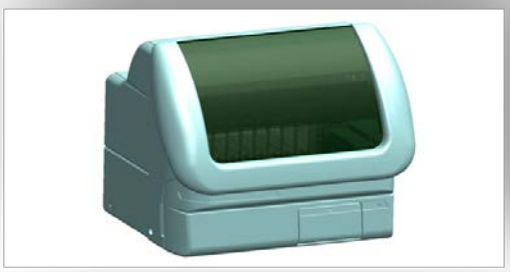
es. colonie sviluppate dopo semina automatica

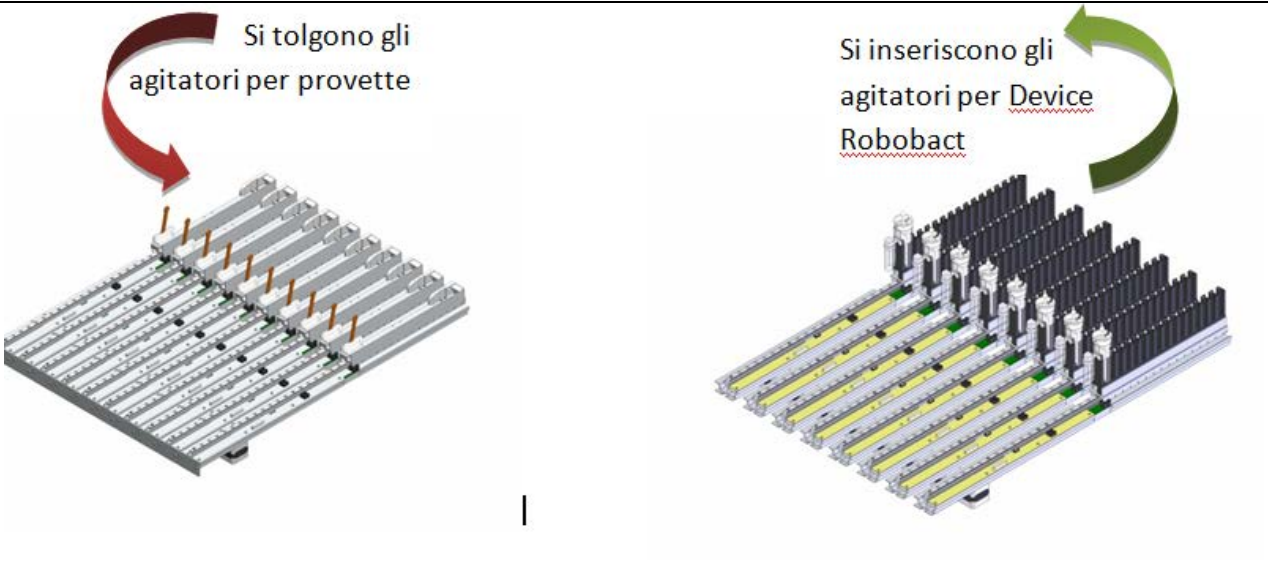
es. di preprocessing di immagine

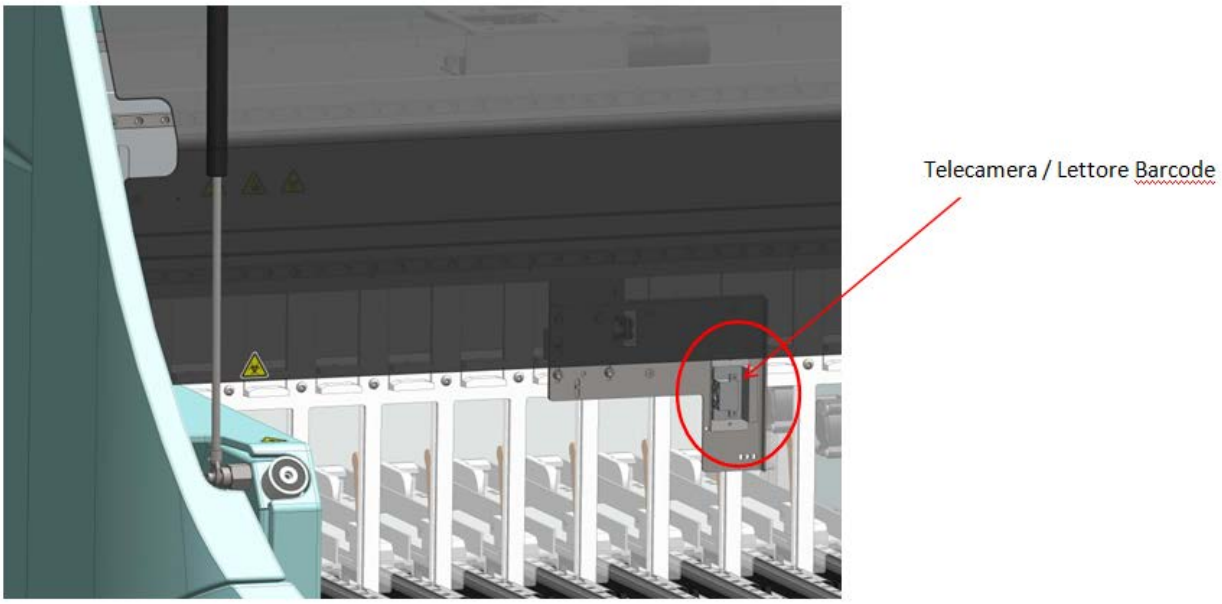
L'attività iniziata secondo le previsioni si è conclusa con l'ingegnerizzazione del seminatore automatico con la capacità di eseguire una identificazione e conta presuntiva della colonie seminate su device dedicato di Diesse.

Questo strumento è stato ingegnerizzato partendo dal layout del Plus Finder Analizzatore modificando alcune parti meccaniche interne , consentendo di i mantenere Il desing uguale .



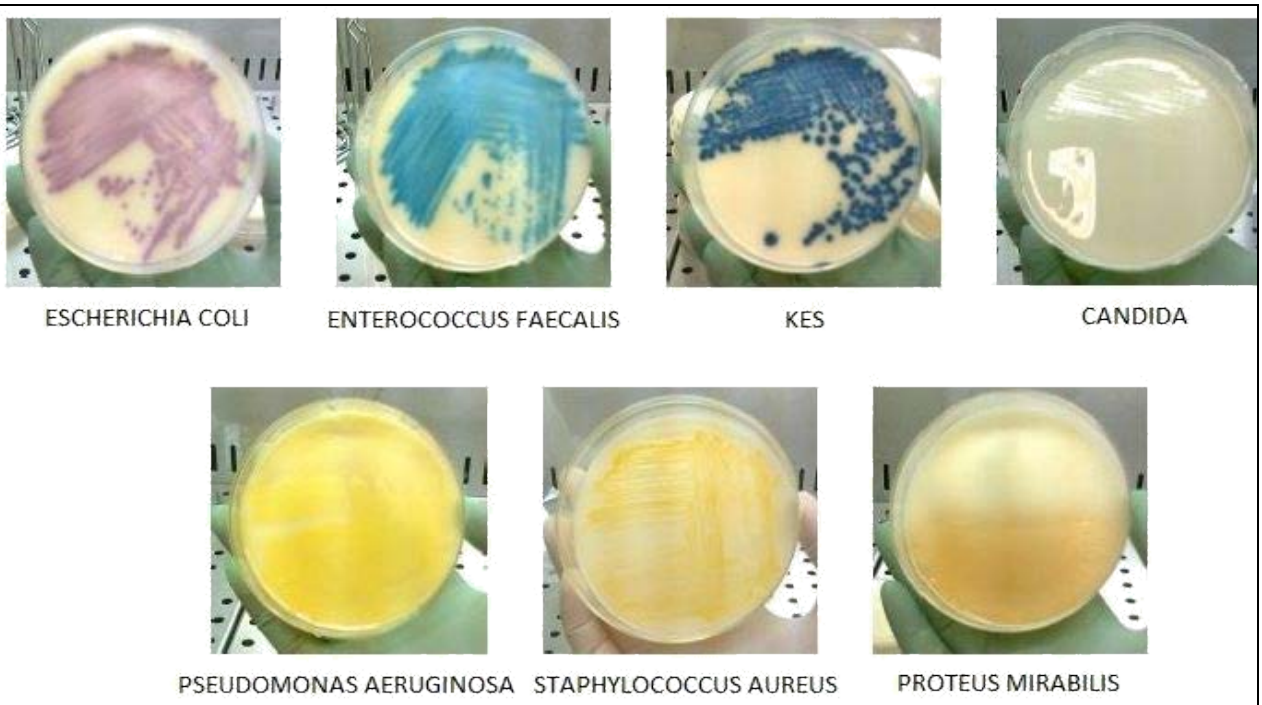
Quindi : Partenza dalla Struttura Plus Finder Analizzatore



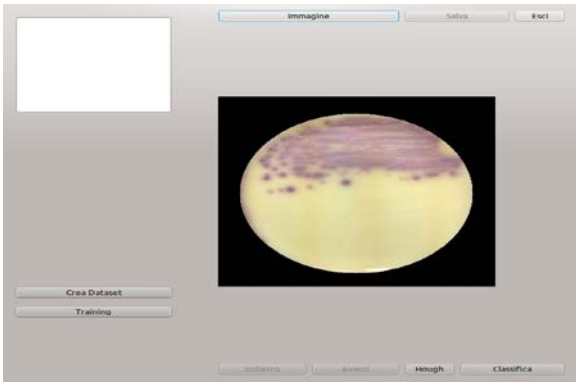


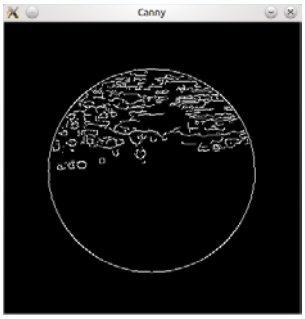
ATTIVITA' 2: Sviluppo software di elaborazione

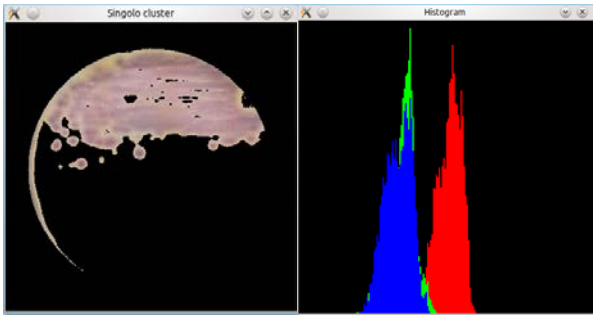
Lo sviluppo del software, cosi come richiesto dall'attività precedente, è stato per il momento realizzato per il riconoscimento di colonie nate su piastra a seguito di semina manuale e non automatica. Questo per facilitare e velocizzare l'ottenimento di strumenti da applicare in piccole valutazioni interne.



es. di libreria immagini su piastra







es. elaborazione

Questa attività è stata ripresa e conclusa svolgendo un progetto abbastanza complesso e articolato come riportato di seguito .

Durante un prima fase è stato sviluppato un modello teorico di software per l'elaborazione delle immagini , molto piu' performante rispetto a quello fino ad ora studiato.

Si è poi proceduto alla realizzazione di un piccolo prototipo per acquisire le immagini da elaborare.

Introduzione

Negli ultimi anni, alcuni ambiti di ricerca tipici dell'Ingegneria Informatica, quali la Computer Vision e la Bioinformatica, hanno sollevato grande interesse ed hanno conosciuto un notevole sviluppo. Sempre più spesso, infatti, vengono utilizzati gli strumenti propri dell'informatica, ed in particolare dell'Intelligenza Artificiale, sia per affrontare problematiche tipiche della Biologia Molecolare che per progettare e sviluppare strumenti biomedici, utili nel settore della diagnostica di laboratorio.
L'obiettivo di questa tesi è quello di realizzare un sistema automatico per effettuare lo screening delle infezioni del tratto urinario; il progetto è stato svolto presso l'azienda Diesse Ricerche s.r.l. di Siena:
Non esiste ancora nessuno strumento che permetta di eseguire la fase di riconoscimento e di conta delle colonie batteriche.
Il sistema sviluppato i sfrutta un semplice dispositivo di acquisizione (webcam) collegato ad un computer. Il software prevede un'interfaccia
grafica che permette di avviare l'acquisizione delle immagini e di mostrare a video il risultato dell'elaborazione. Lo scopo del progetto, al momento, è quello di fornire un supporto per il biologo; quindi, al termine della procedura, verranno visualizzati i risultati che, in caso non fossero corretti, potranno essere modificati. L'oggetto così sviluppato offre notevoli vantaggi:
a) l'intervento del biologo è richiesto solo in caso di errore, il che consente di velocizzare la procedura;
b)si evita un continuo passaggio tra ambiente sterile e ambiente non protetto;
c)al termine delle analisi, i risultati (immagine, tipologia di infezione e conta batterica) vengono memorizzati, rendendoli così disponibili per future consultazioni.

L'organizzazione del presente lavoro è riportata di seguito.
Nella FASE 1, vengono introdotti gli aspetti microbiologici alla base del processo che si intende automatizzare. Vengono descritti i principali batteri causa delle infezioni delle vie urinarie, i terreni disponibili e le varie tecniche utilizzate in fase di semina.
Nel FASE 2, vengono invece presentati i principali strumenti di elaborazione delle immagini, utilizzati nello sviluppo del progetto software, mentre la fase
3 descrive i dettagli implementativi, il funzionamento dei diversi moduli software e le scelte progettuali che hanno portato al loro sviluppo. Il codice è stato realizzato in linguaggio C++, sviluppato in ambiente QtCreator, su Ubuntu 14.04 a 64 bit. Per la parte di elaborazione delle immagini è stata utilizzata la libreria OpenCV.
Infine, il Capitolo 4 trae alcune conclusioni sul lavoro svolto e ne descrive i possibili

sviluppi futuri.

1 Aspetti microbiologici del processo di screening
1.1 Le Infezioni delle vie urinarie
Le infezioni delle vie urinarie sono molto comuni, in particolare nella popolazione femminile. Alcune tipologie più semplici di infezione, come la cistite, possono spesso essere diagnosticate basandosi esclusivamente sui sintomi, mentre, per
quanto riguarda le tipologie di infezioni nelle quali il paziente non presenta sintomi evidenti, è necessario andare ad effettuare l'urinocoltura, per verificare l'effettiva presenza di batteri. In natura, esistono centinaia di specie batteriche, suddivise in aerobi (microrganismi che crescono in presenza di ossigeno) ed anaerobi (batteri capaci di crescere in assenza di ossigeno). La maggior parte delle infezioni del tratto urinario sono provocate da batteri aerobi; il batterio che è più frequentemente causa di infezioni è l'Escherichia Coli, responsabile di circa l'80% dei casi, seguito dallo Staphylococcus Saprophyticus, con circa il 10%. Viceversa, per pazienti ospedalizzati, l'Escherichia Coli è responsabile di circa il 50% delle infezioni rilevate, le specie Klebsiella, Proteus, ed Enterobactere Serratia di circa il 40%, e l'Enterococcus Faecalis e lo Staphylococcus (Saprophyticus, Aureus) delle rimanenti.
Una classificazione delle infezioni in base alla loro uro-patogenicità 1
è stata proposta dall'ECLM (European Confederation of Laboratory Medicine), che ha individuato tre gruppi principali di infezioni:
PATOGENI CONVENZIONALI PRIMARI

Escherichia Coli: batterio Gram negativo

; la temperatura ideale del
batterio è di 37°, ovvero quella del corpo umano; questo tipo di infezione
è più comune nella donna e causa frequente stimolo ad urinare, urina
torbida, febbre e dolori ai reni.
1
Uro-patogenicità: capacità di un microrganismo di apportare danni all'apparato urinario, subordinata
alla situazione clinica del paziente.
2
Colorazione di Gram: metodo colorimetrico utilizzato per contraddistinguere chimicamente e
strutturalmente la parete cellulare dei batteri. I batteri vengono colorati con cristal violetto e, in seguito,
decolorati con solventi organici; infine, vengono controcolorati con safranina o fucsina basica. I batteri
che mantengono il colore violetto vengono definiti Gram positivi, quelli che invece vengono decolorati e
assumono un colore rosso sono definiti Gram negativi.
9
o
Staphylococcus Saprophyticus: è un tipo di batterio anaerobico facoltativo

3
, Gram positivo e di forma sferica. Cresce facilmente nei terreni di coltura, producendo un pigmento che va dal bianco al giallo; la specie Saprophyticus è spesso causa delle infezioni dell'apparato urinario nelle donne giovani.

PATOGENI CONVENZIONALI SECONDARI

Enterococcus spp.

: batterio Gram positivo, implicato in patologie come endocarditi e infezioni del tratto urinario.

Proteus spp.: appartiene alla classe degli Enterobatteri; una delle caratteristiche principali di questo batterio è l'elevata mobilità, che gli conferisce una morfologia di colonia ad anelli concentrici su terreni solidi.

Pseudomonas Aeruginosa: vive nel suolo, dove svolge la denitrificazione5
; si presenta prevalentemente nei pazienti ospedalizzati debilitati e nei pazienti con l'HIV. Può causare infezioni agli apparati urinario e respiratorio dell'uomo.

Staphylococcus Aureus: batterio anaerobico facoltativo che presenta una pigmentazione gialla e produce una tossina responsabile di varie malattie, come meningiti, artriti e polmoniti.o
KES (Klebsiella spp., Enterobacter spp., Serratia spp.): gruppo di patogeni aggressivi che acquisiscono geni per la farmaco-resistenza.

PATOGENI CONDIZIONALI

Miceti lievitiformi (Candida albicans): responsabili della maggior parte delle candidosi; le infezioni da Candida possono colpire singolarmente ogni organo o apparato.

Streptococcus: batterio Gram positivo, anaerobico facoltativo; di forma sferica, è capace di distruggere i globuli rossi attraverso la produzione di una tossina, la streptolisina.

Stenotrophomonas Maltophilia: batterio Gram negativo; molto diffuso nella flora batterica dell'uomo, nelle acque e nel suolo. Spesso causa di infezioni gravi nei reparti di terapia intensiva.

Batterio anaerobico facoltativo: batterio che cresce sia in presenza che in assenza di ossigeno.

Spp.: che comprende ogni tipo di specie di quel batterio

Denitrificazione: capacità dei batteri di convertire i composti di azoto solubili in azoto gassoso.

Infine esiste un quarto gruppo di batteri in cui sono compresi microrganismi contaminanti, come i difteroidi e lattobacilli.

1.2 Analisi dei campioni di urina
Per rilevare ed analizzare il tipo di infezione occorre effettuare l'urinocoltura, sottoponendo i campioni di urina a condizioni che ne favoriscano la proliferazione batterica. A tale scopo, vengono usati terreni di coltura che hanno il compito di ricreare artificialmente l'ambiente favorevole allo sviluppo e alla crescita dei batteri. Un terreno nutritivo deve contenere un bilanciamento di sostanze organiche e inorganiche, necessarie alla crescita. I terreni di coltura vengono utilizzati per molteplici applicazioni, quali, ad esempio, il conteggio e l'isolamento dei microrganismi, la produzione e la valutazione di preparati farmacologicamente attivi, etc.
In base alla loro costituzione chimica, i terreni di coltura si suddividono in:
1 terreni minimi: consentono la crescita della maggior parte dei tipi di batteri in quanto il fattore che limita lo sviluppo è aggiunto in quantità minime;
2 terreni comuni: sono utilizzati per la coltivazione di batteri che non hanno particolari esigenze nutritive;
3 terreni sintetici: sono prodotti utilizzando quantità specifiche di costituenti organici e inorganici adatti ad una singola specie di batterio;
4 terreni complessi: sono terreni ricchi di substrati organici di cui non si conoscono le quantità precise.
I terreni possono anche distinguersi in base alle tipologie batteriche che consentono di isolare e rilevare:
5 terreni di arricchimento: consentono la sopravvivenza di una sola specie batterica, quindi arricchiscono un'unica popolazione, inibendo la crescita delle altre;
6 terreni differenziali: permettono di riconoscere le singole specie batteriche grazie alla presenza di indicatori delle reazioni che avvengono nello stesso terreno;

a) terreni liquidi: consentono un rilevamento più sensibile rispetto ai terreni solidi, riducendo notevolmente i tempi di coltura batterica;
b) terreni allo stato solido: sono utilizzati in contenitori di vetro o di plastica di forma cilindrica, chiamati piastre o capsule di Petri (Figura 1.1).

Il terreno
solido viene preparato disciogliendo tutte le sostanze ad una temperatura di 150° e lasciandole in ebollizione per un'ora. Nel momento in cui il terreno è pronto, deve essere sterilizzato, prima di poterlo impiegare come mezzo di coltura; se la sterilizzazione non viene eseguita subito, si rischia che la crescita di contaminanti possa alterarne la qualità.

Figura 1.1: Terreni solidi: il colore dipende dalle sostanze utilizzate per produrli

Una volta pronto, il terreno solido può essere utilizzato per seminare un campione di urina. I terreni solidi maggiormente impiegati sono:

- terreni all'uovo: sono realizzati utilizzando uova fresche, fecola di patate, sale e glicerolo; vengono fatti solidificare per coagulazione al calore. Possono essere conservati in frigorifero per mesi, ma non consentono lo sviluppo precoce delle colonie;
- terreni a base di agar: per realizzarli sono utilizzati sali, vitamine, acido oleico, albumina, catalasi, glicerolo e destrosio. Le colonie batteriche crescono velocemente e, data la trasparenza del terreno, possono essere osservate al microscopio.

La semina deve essere eseguita osservando tutte le precauzioni necessarie a non contaminare il mezzo di coltura. Di seguito sono riportate alcune tra le tecniche più comunemente utilizzate:

1_ Semina per incorporamento: il terreno viene preparato e, raggiunta la temperatura di 45°50°, viene versato nelle piastre; si preleva 1 ml del campione e si distribuisce la sospensione microbica in modo omogeneo sul terreno, effettuando delicati movimenti rotatori, orizzontali e verticali della piastra.

2_Semina per spatolamento superficiale: il terreno viene preparato 24 ore prima affinché possa asciugarsi; quindi viene versato nelle piastre di Petri e lasciato solidificare; si preleva 0.1 ml di campione e, con l'aiuto di una spatola "a L", viene distribuito in modo uniforme su tutta la superficie. Questa tipologia di semina viene eseguita quando si ha la necessità di evidenziare la morfologia delle colonie.

3_Semina in doppio strato: viene diluita una sospensione di 1 ml di campione nel terreno ancora non solidificato; dopo la solidificazione, vengono seminati altri 8 ml. Questo sistema viene utilizzato quando si devono analizzare microrganismi anaerobi facoltativi.

4_Semina per infissione: il terreno non viene fatto solidificare del tutto; con un ago di platino viene prelevata una minima quantità di campione e viene iniettata nel terreno. Questa tecnica può essere utilizzata sia in provetta che in piastra.

5_Semina in alto strato: il terreno viene sciolto in provette e viene fatto raffreddare fino alla temperatura di 50°; il campione viene prelevato tramite una pipetta e viene lasciato cadere immergendo lo strumento all'interno del terreno. La semina in alto strato viene eseguita quando si vogliono ricreare condizioni di anaerobiosi per microrganismi anaerobi.

6_Tecnica dello striscio: il campione viene prelevato utilizzando un'ansa calibrata

per distribuirlo sul terreno, effettuando strisciamenti delicati su tutta la superficie, come mostrato in Figura 1.2. Questa tecnica è utilizzata quando si vogliono differenziare le singole colonie.

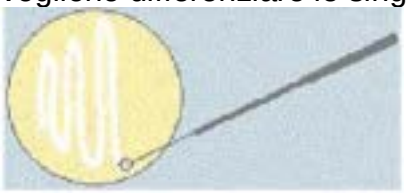
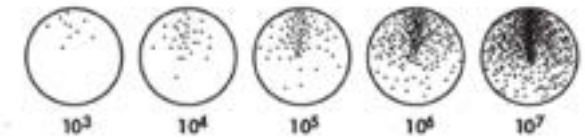


Figura 1.2: Tecnica dello striscio

Per ottenere una buona coltura, occorre scegliere opportunamente la temperatura e le concentrazioni di anidride carbonica e di ossigeno. Per osservare le colonie batteriche, occorre lasciare in incubazione la piastra per circa 18̃24 ore ad una temperatura di 37°; la piastra viene capovolta per evitare che la condensa generata cada sul terreno. I batteri crescono formando colonie isolate ed è possibile distinguerne il tipo in base alla forma, alla grandezza, alla superficie (liscia, rugosa o brillante), o in base ai margini e all'opacità. Tuttavia, la caratteristica che più facilmente permette di distinguere le diverse specie batteriche è la cromogenesi, ovvero il colore del pigmento rilasciato.
Per eseguire la conta batterica in piastra viene utilizzata la seguente formula:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} \qquad (1.1)$$

dove corrisponde al numero di colonie contate, n_1 ed n_2 rappresentano il numero di piastre utilizzate rispettivamente per la prima e per la seconda diluizione e d è il fattore di diluizione. Il numero di microrganismi presenti viene espresso in UFC/g (Unità Formanti Colonie) per i terreni solidi e UFC/ml per i terreni liquidi.



.

Figura 1.3: Esempi di conta batterica
Valori inferiori a
10 e 4 sono solitamente indice di contaminazione, mentre valori maggiori o uguali a 10 e 5 indicano una probabile infezione.
Mentre la procedura di semina è già stata efficacemente automatizzata, il processo di identificazione e conta prevede a tutt'oggi l'intervento manuale di un esperto umano. L'operazione di analisi della piastra deve essere effettuata in un ambiente sterile (cappa), mentre la trascrizione dei risultati viene eseguita all'esterno della cappa. L'operazione risulta quindi essere molto laboriosa a causa della necessità del passaggio continuo tra ambiente sterile e ambiente non protetto. Automatizzare il

processo di riconoscimento può essere perciò molto vantaggioso, non solo in termini di tempi e costi, ma anche per facilitare il compito dell'operatore, riducendone il carico di lavoro e quindi la probabilità di errore.

1.3 Uriselect 4

Uriselect 4 è un terreno gelatinoso non selettivo, composto da una base nutritiva ricca, contenente quattro peptoni, che assicura la coltura di tutti i germi urinari. Questo terreno contiene due substrati cromogeni per il rilevamento degli enzimi batterici ß galattossidasi e ß glucosidasi; contiene inoltre triptofano per, l'evidenziazione dell'attività della triptofanasi (produzione d'indolo) e della triptofan͂odesaminasi (TDA). Questo terreno consente di identificare direttamente, tramite l'evidenziazione di attività enzimatiche, i batteri più comunemente responsabili delle infezioni urinarie.

L'E.coli viene individuato mettendo in evidenza l'attività di due enzimi: la ß galattosidasi e la triptofanasi. La scissione, tramite ß galattosidasi, del primo substrato cromogeno contenuto in questo terreno, provoca la colorazione delle colonie che virano al rosa.

L'attività della TDA provoca una colorazione marron͂earancio che è caratteristica dei batteri appartenenti al gruppo Proteus–Providencia–Morganella.

Gli enterococchi vengono rilevati in base alla presenza di una ß glucosidasi (esculinasi); la scissione, tramite questo enzima, del secondo substrato cromogeno contenuto nel terreno induce nelle colonie una colorazione blu turchese. Inoltre le colonie che formano gli enterococchi sono di piccole dimensioni (Ø = 0,5–1,5mm).

Le specie batteriche che presentano la doppia attività enzimatica della ß galattosidasi e della ß glucosidasi formano delle colonie di colore blu violaceo; se inoltre queste colonie risultano essere di grandi dimensioni (Ø = 2,0–3,0mm) è molto probabile trovarsi in presenza di un batterio appartenente al gruppo K.E.S. (Klebsiella–Enterobacter–Serratia).

Molto raramente alcuni ceppi appartenenti al gruppo K.E.S. presentano una modesta attività ß galattosidasi: in questi casi le colonie assumono una colorazione intermedia, tra il blu violaceo e il blu turchese.

2 Tecniche di Elaborazione delle Immagini

Nel presente capitolo vengono brevemente illustrate le diverse tecniche di computer vision che sono state adottate per estrarre dalle immagini delle piastre di Petri acquisite via webcam, le informazioni necessarie a rilevare la presenza ed il tipo di colonie batteriche (ed effettuarne la conta).

2.1 Motion Detection

L'applicazione sviluppata deve catturare l'immagine solo quando la piastra di Petri è stata posizionata correttamente sul supporto. A tal fine è stato utile rilevare il movimento in modo da evitare il salvataggio delle foto durante le operazioni di inserimento e rimozione della piastra.

Il motion detection consiste nella ricerca di un insieme di oggetti in movimento all'interno di una scena. Il modulo che effettua il rilevamento del movimento (motion detection) prevede una fase di preprocessing, in cui vengono acquisiti i pixel in movimento nel frame in esame; successivamente i pixel precedentemente rilevati possono essere raggruppati in regioni omogenee logicamente connesse (blob). I metodi più semplici per l'identificazione dei pixel in movimento si basano sulla differenza tra frame successivi (frame difference), oppure effettuano il confronto dell'immagine attuale con un background. Nel secondo caso, l'immagine corrente di una sequenza

viene confrontata con un background di riferimento, contenente informazione sulla scena in assenza di oggetti in movimento. Questa tecnica si fonda sul presupposto che vi sia un background e soprattutto che possa essere mantenuto aggiornato, per riflettere i cambiamenti a breve e a lungo termine. Nel caso di algoritmi basati su frame difference,invece, si considerano solo le differenze presenti tra i valori di luminosità dei pixel corrispondenti nelle due immagini successive di una sequenza, così da evidenziare come pixel in movimento quelli che, nell'immagine differenza, assumono un valore di luminosità diverso da 0.

In quest'ultimo caso, le principali fasi di elaborazione sono le seguenti:

- Salvare una copia del frame attuale e del frame precedente in scala di grigi;
- Calcolare la differenza fra i due frame:

$$D(i,j) = |CurrFrame(i,j) - PrevFrame(i,j)|$$

- Effettuare un threshholding del risultato ottenuto;
- Applicare un filtro per ridurre l'eventuale rumore;
- Rilevare il movimento se nell'immagine così ottenuta esistono pixel con valore diverso da 0.

Questo metodo è il più semplice da realizzare ed è utile solo al fine di rilevare la presenza o meno di movimento. Per applicazioni più complesse, che prevedono di identificare l'oggetto in movimento, questo sistema introduce una serie di problematiche, quali, ad esempio, la duplicazione di un oggetto che all'interno dell'immagine si muove troppo velocemente.

Figura 2.5: Frame difference rilevata tra il frame attuale e il frame precedente

2.2 Trasformata di Hough

Oltre a controllare che non ci siano oggetti in movimento nella regione di acquisizione è necessario verificare l'effettiva presenza della piastra di Petri sul supporto prima di catturare l'immagine. Dato che la piastra è di forma circolare è stata sfruttata la trasformata di Hough al fine di rilevare le circonferenze presenti all'interno dell'immagine.

In computer vision, esistono innumerevoli tecniche per l'estrazione di feature;
una di queste è la trasformata di Hough [12], che viene utilizzata per individuare oggetti di una determinata forma all'interno di un'immagine. Ideata nella sua forma base agli inizi degli anni '60 da Paul Hough, fu in seguito perfezionata in una forma generalizzata e resa popolare nel 1981 da Dana H. Ballard, docente di informatica dell'Università del Texas.

La trasformata di Hough necessita di un passo di preprocessing finalizzato all'Edge Detection (es. Canny Edge Detection). L'immagine così ottenuta sarà rappresentata in scala di grigi, dove i pixel bianchi rappresentano gli edge, ovvero i contorni degli oggetti presenti. L'obiettivo dell'applicazione della trasformata di Hough è quello di identificare quali di questi contorni rappresentino una linea retta: se più pixel di edge sono allineati, anche se non connessi tra loro, viene infatti individuata una linea all'interno dell'immagine. Per rappresentare una linea retta servono due parametri: un coefficiente angolare **m** e una ordinata all'origine **C**
. Considerato un singolo punto, questo appartiene a infinite rette della forma:

$$y = mx + c \tag{2.1}$$

al variare di m e c. Dobbiamo quindi stabilire quali coppie (m, c) siano in grado di individuare al meglio gli allineamenti di pixel. Fissato un punto (x, y), l'equazione $y = mx + c$ andrà a rappresentare una sola retta nello spazio (m, c), corrispondente alle infinite rette che passano per (x, y). Nello spazio parametrico vengono quindi rappresentate tante rette quanti sono i pixel di edge. Se due di queste rette s'intersecano, i punti corrispondenti dell'immagine risulteranno allineati sulla retta con coefficienti (m, c). Le rette corrispondenti ad un alto numero di intersezioni nello spazio parametrico rappresentano le linee di interesse.

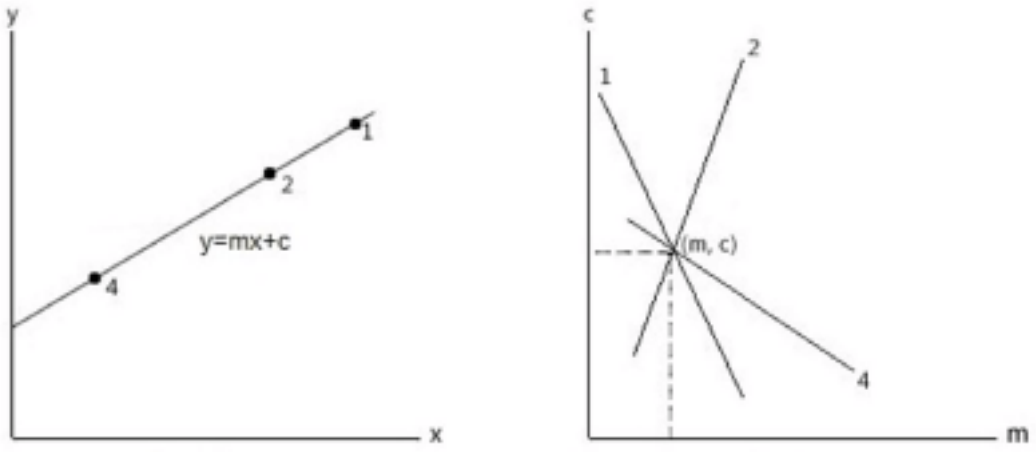


Figura 2.1: Rappresentazione nello spazio (x,y) e nello spazio dei parametr (m, c)

La trasformata di Hough descritta in questa forma non è tuttavia implementabile su un calcolatore. Infatti, per le linee verticali, il coefficiente angolare m tende all'infinito, e quindi diviene non rappresentabile in aritmetica finita. Si ricorre quindi a una versione della trasformata, detta forma normale, dove le rette vengono rappresentate come

$$x \cos\theta + y \sin\theta = r \qquad (2.2)$$

I parametri θ e r sono rispettivamente l'angolo (rispetto all'asse x) e la distanza della retta dall'origine. Quantizzando θ e utilizzando come spazio parametrico (θ, r) si risolve quindi il problema della rappresentazione finita dei dati.

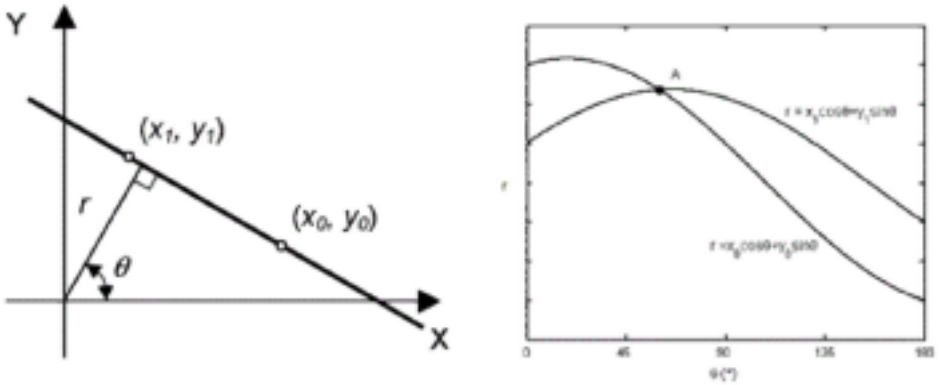


Figura 2.2: Rappresentazione dello spazio dei parametri in coordinate polari

Per l'implementazione pratica della trasformata di Hough, è necessario quantizzare adeguatamente lo spazio dei parametri e successivamente rappresentarli in un array di memoria, anche detto array accumulatore ("accumulator array"). Per ogni punto dello spazio immagine è necessario tracciare la curva ad esso associata all'interno dell'accumulatore. Ciò viene fatto valutando l'equazione che definisce la mappatura dallo spazio immagine sullo spazio dei parametri ed incrementando ogni cella dell'array accumulatore per il quale tale equazione è soddisfatta. Questo processo viene anche detto "voting". Ogni cella dell'array accumulatore conterrà un valore che rappresenta il numero di voti, che è pari al numero di curve che attraversano la cella. Perciò le celle che avranno il valore più elevato corrisponderanno ai punti nello spazio dei parametri in cui si intersecano numerose curve.

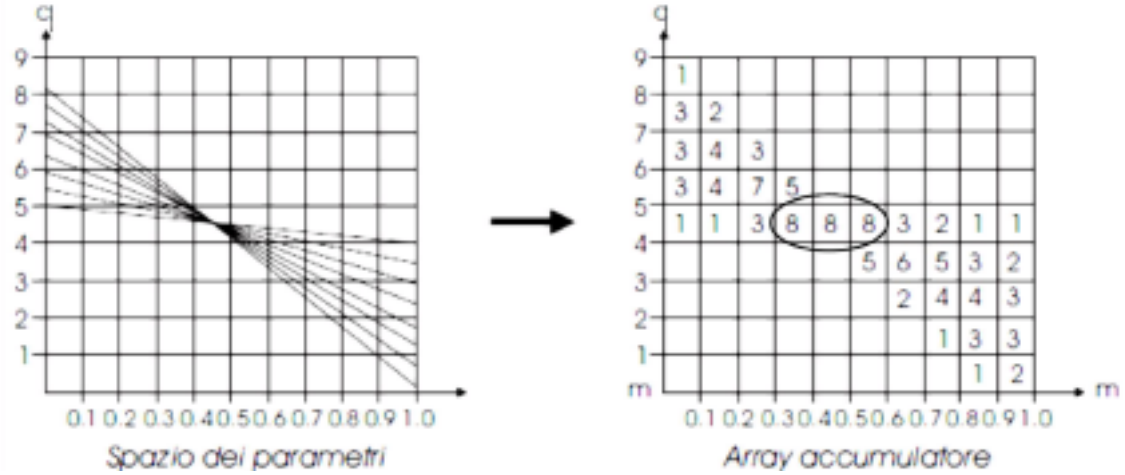


Figura 2.3: Rappresentazione dello spazio dei parametri all'interno dell'array accumulatore

Se invece si volessero individuare contorni circolari all'interno delle immagini, si può utilizzare una versione estesa della trasformata di Hough per la rilevazione di circonferenze. Si consideri la seguente parametrizzazione, che permette di descrivere circonferenze nel piano:

$$(x - a)^2 + (y - b)^2 = r^2 \tag{2.3}$$

dove a e b rappresentano il centro della circonferenza mentre r è il raggio. Ogni punto (x_i, y_i) appartenente allo spazio immagine può essere trasformato in una superficie nello spazio dei parametri (a, b, r) secondo l'equazione:

$$(x_i - a)^2 + (y_i - b)^2 = r^2 \tag{2.4}$$

La superficie nello spazio tridimensionale dei parametri associata a un punto P dell'immagine è un cono circolare con vertice in P. Se si fissa un raggio $r = \bar{r}$, si ottiene una circonferenza di centro P e raggio pari a $\bar{r}$, che rappresenta il luogo dei centri dei cerchi passanti per il punto dato ed aventi raggio pari al valore fissato.

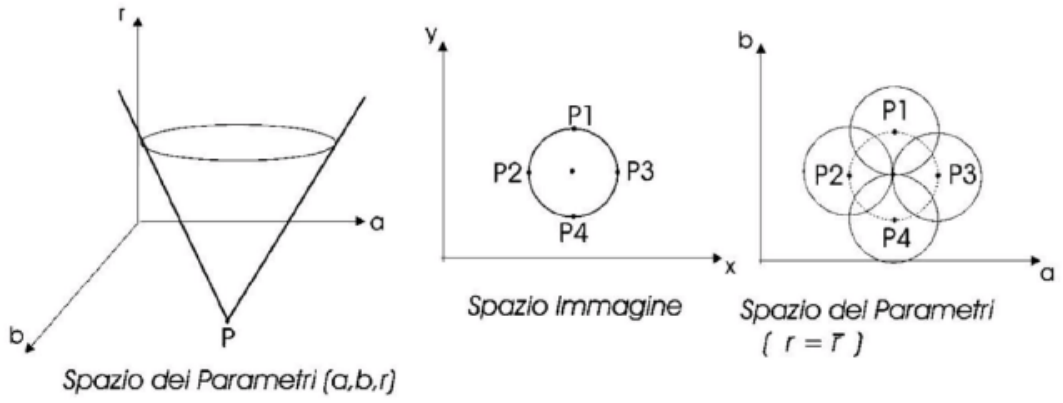


Figura 2.4: A sinistra è rappresentato lo spazio dei parametri a,b,r; al centro, lo spazio immagine in cui è rappresentata la circonferenza in esame; a destra, la rappresentazione dello spazio dei parametri con raggio r fissato

Nell'implementazione della trasformata di Hough per i cerchi, lo spazio dei parametri deve essere quantizzato e rappresentato tramite un accumulatore tridimensionale. L'accumulatore può essere visto come una successione di layer che rappresentano i valori discreti del raggio. Nel procedimento di "voting" viene quindi scandito l'intervallo discreto dei raggi e, per ogni punto, vengono incrementate le celle attraversate dalla circonferenza centrata nel punto ed avente raggio pari al valore corrente del raggio. Ipoteticamente, la trasformata può essere applicata a qualsiasi equazione parametrica, ma la limitazione più grande è dovuta all'elevata complessità computazionale, che cresce con l'aumentare del numero di parametri. Se non si usano particolari accorgimenti o informazioni conosciute, utilizzare equazioni con un numero di parametri superiore a quattro può diventare particolarmente critico dal punto di vista computazionale, poiché è necessario un array a molte dimensioni, con conseguente utilizzo eccessivo di memoria.

2.3 Filtri

Per provare ad eliminare dalle immagini l'eventuale rumore sale e pepe oppure gli spike isolati introdotti dal sistema di acquisizione è stato necessario applicare alcuni filtri.

2.3.1 Filtro Mediano

Se l'obiettivo del filtraggio è la riduzione del rumore ma non il blurring, cioè se si desidera una immagine meno rumorosa ma che mantenga i dettagli, i filtri di media non danno risultati soddisfacenti. Si può ricorrere quindi al filtro mediano ([10] *cap. 6.4.6*), per effetto del quale un pixel è sostituito dal valore mediano dei pixel nell'intorno. Si tratta di un filtro non lineare; dato un frammento d'immagine come quello in *Figura 2.6*, ad esempio, un filtro mediano 3×3 opera nel seguente modo:

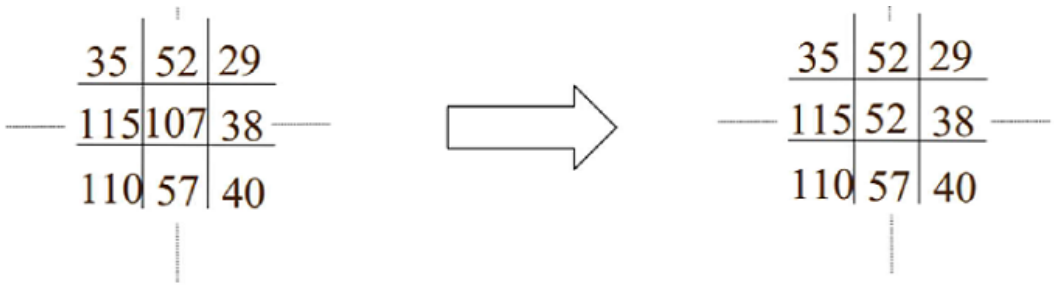


Figura 2.6: Frammento di immagine a cui viene applicato il filtro mediano

La mediana M di un insieme di valori è tale che metà dei valori sono minori di M e metà dei valori sono maggiori di M. Pertanto, nell'intorno di ogni pixel si devono ordinare i valori dei pixel in esso contenuti, compreso quello centrale, per assegnare il valore mediano al pixel centrale. Nell'esempio, si ha: 29, 35, 38, 40, 52, 57, 107, 110, 115, per cui il valore mediano è 52.

L'effetto del filtro mediano è di forzare i pixel ad assumere un valore uguale a quello di uno dei pixel circostanti, eliminando così eventuali spike isolati d'intensità,

che sono quelli con cui spesso si manifesta il rumore. Come possiamo vedere dall'esempio riportato in *Figura 2.7*, il filtro mediano elimina il rumore e mantiene i dettagli.

Figura 2.7: La prima immagine contiene rumore al 10%, alla seconda immagine è stato applicato un filtro Blur 5×5, mentre alla terza immagine è stato applicato un filtro mediano

2.3.2 Filtro Morfologico

Si può usare la morfologia matematica per rappresentare e descrivere le forme degli oggetti presenti in un'immagine [11]. In tal caso, il valore di ogni pixel dell'immagine in uscita è determinato mediante un confronto del pixel corrispondente dell'immagine in ingresso con i suoi vicini. Scegliendo opportunamente la dimensione e la forma del vicinato, è possibile costruire operazioni morfologiche che sono sensibili a specifiche strutture geometriche. Il vicinato può essere definito dalle posizioni che i pixel hanno rispetto a quello da elaborare, mediante un elemento strutturante. L'elemento strutturante è di solito rappresentato da "una forma" usata per esaminare le proprietà di interesse di un'immagine.

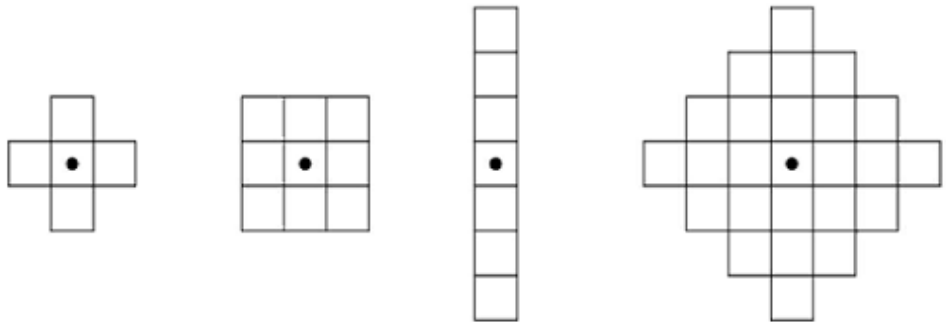


Figura 2.8: Esempi di elementi strutturanti

In modo simile a quanto accade per il filtraggio bidimensionale, l'elemento strutturante rappresenta la maschera con cui modificare i pixel, in questo caso però attraverso operazioni di logica booleana.

I filtri morfologici trattano le immagini come insiemi di punti (x, y). Un'immagine è quindi vista come un insieme

$$A \subseteq \mathbb{Z}^2$$

mentre il filtro morfologico è una funzione che trasforma un insieme di punti in un altro insieme di punti:

$$f: \mathbb{Z}^2 \to \mathbb{Z}^2$$

Definiamo la traslazione di un'immagine A per mezzo di un punto $z = (z_1, z_2)$ come:

$$(A)_z = \{b + z : b \in A\} \tag{2.5}$$

Definiamo inoltre la riflessione di un'immagine A come:

$$\hat{A} = \{-b : b \in A\} \tag{2.6}$$

Valgono infine tutte le operazioni insiemistiche classiche.

Possiamo adesso definire due operazioni morfologiche fondamentali, che sono la dilatazione e l'erosione: la dilatazione aggiunge pixel ai contorni di un oggetto, mentre l'erosione li rimuove. Il numero di pixel aggiunti o rimossi dipende dalla forma e dalla dimensione dell'elemento strutturante.

In modo più formale la dilatazione di A con B (elemento strutturante) si definisce come:

$$A \oplus B = \{z | (\hat{B})_z \cap A \neq \emptyset\} \tag{2.7}$$

ovvero, la dilatazione di A con B è l'insieme di tutte le traslazioni tali che $\hat{B}$ e A si sovrappongano almeno per un elemento. Questa operazione rende "più spessi" gli oggetti presenti in un'immagine binaria. Supponiamo, per esempio, di avere la seguente sezione d'immagine:

$x(m,n) =$

1	0	0	0	0
0	1	0	0	0
0	0	1	0	0
0	0	0	1	0
0	0	0	0	1

e di considerare come elemento strutturante la matrice:

$b(m,n) =$

1	**1**	1

Questo significa che il vicinato di un pixel è costituito dai due pixel vicini nella direzione orizzontale. La dilatazione di $x(m,n)$ mediante l'elemento strutturante $b(m,n)$ fornisce in uscita il valore 1 se, facendo scorrere $b(-m,-n)$ su $x(m,n)$ nel vicinato del pixel in esame è presente almeno un 1. In questo caso si ottiene in uscita la seguente immagine:

$y(m,n) =$

1	1	0	0	0
1	1	1	0	0
0	1	1	1	0
0	0	1	1	1
0	0	0	1	1

Si noti che per ottenere anche i valori ai bordi, l'immagine è stata estesa con valori nulli (zero–padding). Se l'elemento strutturante fosse stato:

$b'(m,n) =$

1	0	0
0	**1**	0
0	0	1

l'uscita sarebbe stata coincidente con l'immagine in ingresso $x(m,n)$ perché la forma scelta per la struttura è identica a quella presente nell'immagine.

L'erosione invece fornisce il valore 0 se nel vicinato è presente almeno uno 0 (in tal caso l'estensione ai bordi è fatta con tutti 1). Formalmente:

$$A \ominus B = \{z|(B)_z \cap A^c \neq \emptyset\} \qquad (2.8)$$

Se consideriamo sempre la stessa sezione d'immagine $x(m,n)$ e l'elemento strutturante $b(m,n)$, allora è facile riconoscere che in uscita avremo un'immagine costituita da soli elementi nulli. Se invece si fa riferimento alla seguente sezione d'immagine:

$x(m,n) =$

0	0	0	0	0
0	1	1	1	0
0	1	1	1	0
0	1	1	1	0
0	0	0	0	0

e si usa sempre l'elemento $b(m,n)$ si ottiene in uscita:

$y(m,n) =$

0	0	0	0	0
0	0	1	0	0
0	0	1	0	0
0	0	1	0	0
0	0	0	0	0

Le operazioni di dilatazione ed erosione spesso sono combinate nell'image processing; in particolare, se si fa seguire la dilatazione all'erosione si parla di apertura (opening):

$$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B \tag{2.9}$$

mentre, invertendo l'ordine delle operazioni, si ottiene la chiusura (closing):

$$A \cdot B = (A \oplus B) \ominus B \tag{2.10}$$

2.4 Spazi colore

Scopo di un modello del colore è di consentire la rappresentazione dei colori con modalità standardizzate. Questi modelli fanno normalmente riferimento a un sistema di coordinate 3–D. Gli spazi colore ([9] *cap. 1 pag. 42*) più utilizzati in image processing sono orientati o all'hardware di acquisizione (RGB) delle immagini o alla loro trasmissione (YUV, YIQ, YDbDr), alla compressione (YCbCr) ed all'elaborazione (od analisi) mediante trattamento del colore (RGB, HSV, LUV, ...).

2.4.1 RGB

Nel modello (o sistema, o spazio) RGB, probabilmente il più noto, ogni colore è definito mediante le intensità dei tre primari (rosso, verde e blu) che lo compongono. Il modello è basato su un sistema di coordinate cartesiane, in cui il sottospazio di riferimento è un cubo di lato unitario; tutti i valori s'intendono normalizzati in modo da ricadere nell'intervallo [0,1]:

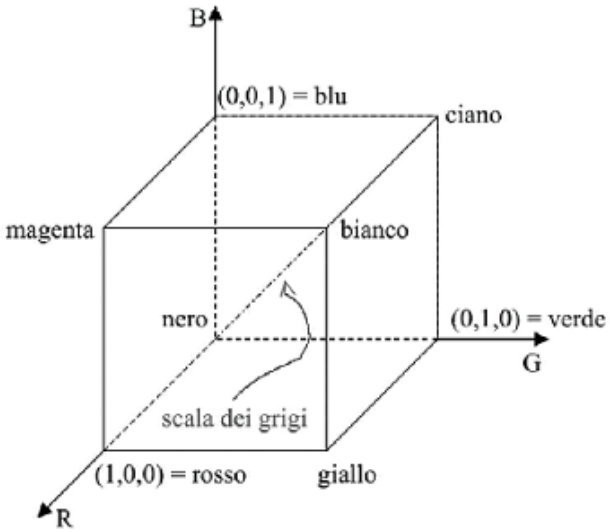


Figura 2.9: Cubo RGB

Rosso, verde e blu sono ai vertici del cubo giacenti sugli assi, mentre ciano, magenta e giallo sono ai vertici opposti. Il nero è all'origine e il bianco è al vertice da essa più lontano, mentre la diagonale che li congiunge è la scala dei grigi. Un particolare colore è rappresentato da un punto sulla superficie o all'interno del cubo. Nel modello RGB, un'immagine a colori consiste di tre immagini di intensità indipendenti, una per ogni colore primario. È lo schema classico utilizzato sia nell'acquisizione che nella visualizzazione, dato che normalmente telecamere, scanner, monitor producono o utilizzano segnali RGB. Il numero dei bit usati per rappresentare ogni pixel nello spazio RGB è la profondità del pixel.

Il modello RGB può risultare poco efficace ai fini dell'elaborazione, in quanto andando a considerare indipendentemente le tre componenti RGB, cambia la crominanza (tinta–saturazione) di ogni pixel, introducendo una distorsione cromatica. Inoltre, in relazione alla percezione del colore da parte del sistema visivo umano che, come è noto, è più sensibile al verde che al rosso e al blu, c'è da aggiungere che una rappresentazione con uguale distribuzione dei dati sui tre canali è sicuramente inefficiente. Per le elaborazioni che implicano il miglioramento della qualità di un'immagine risultano sicuramente più efficaci i modelli del colore in cui la componente di intensità (spesso denominata luminanza) è separata da quelle di crominanza.

2.4.2 XYZ

I colori primari associati allo spazio XYZ sono "virtuali", in quanto non possono essere rappresentati in natura dal momento che contengono valori negativi nel loro spettro. Possiamo distinguere tre caratteristiche del colore:

- Luminosità: intensità del colore;
- Tonalità: è il colore dominante percepito;
- Saturazione: è la purezza del colore, o la quantità di luce bianca mischiata al colore dominante.

I tre colori "primari immaginari", sono stati denominati X, Y, e Z. X corrisponde a un rosso violaceo ipersaturo, contraddistinto da due picchi nello spettro cromatico; Y e Z corrispondono a tinte spettrali sempre irrealisticamente ipersature. Inoltre, la tinta Y (corrispondente al "verde ipersaturo") ha un andamento proporzionale alla nostra sensibilità alla luminosità delle tinte. Scelti i tre primari, tramite i quali è possibile ottenere, per sintesi additiva, qualsiasi tinta reale, si definisce uno spazio tridimensionale di cui essi costituiscono gli assi.

Per non ricorrere a un diagramma tridimensionale, è inoltre possibile normalizzare le tinte, facendo in modo che la loro somma sia sempre pari a uno. Se X, Y, e Z sono i tre valori che identificano un colore, poniamo:

$$x = \frac{X}{X+Y+Z}$$
$$y = \frac{Y}{X+Y+Z} \qquad (2.11)$$
$$z = \frac{Z}{X+Y+Z}$$

da cui risulta che $x + y + z$ è sempre uguale ad 1 per qualsiasi valore originario di X, Y e Z. Da questo si ricava tra l'altro che:

$$z = 1 - x - y \qquad (2.12)$$

ed è dunque possibile utilizzare due sole coordinate cromatiche (x e y, ad esempio) per identificare un colore, essendo la terza (z, in questo caso) ricavabile sottraendo le altre due dall'unità. Il vantaggio è evidente: normalizzando i colori col meccanismo della somma costante (uguale a 1), è possibile utilizzare un grafico bidimensionale per catalogare qualitativamente (e non quantitativamente) tutte le tinte reali. Ovvero, si tracciano tutti i colori possibili la cui intensità totale è costante e pari ad uno: tutte le altre tinte sono ottenute semplicemente indicando, oltre ai valori x e y, il loro grado di luminosità espresso, ad esmpio, in forma percentuale.

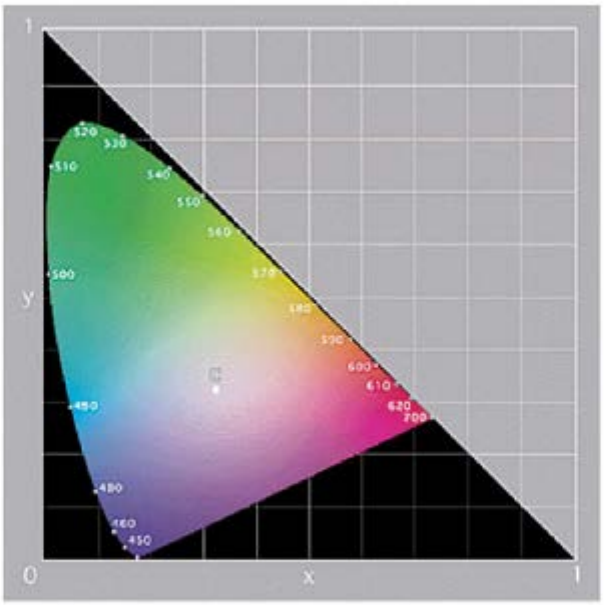


Figura 2.10: Diagramma di cromaticità XYZ

2.4.3 Lab

In molti casi, in cui è necessario misurare la distanza tra due colori, sarebbe utile avere uno spazio colore percettivamente uniforme, in cui cioè la distanza percepita tra due colori sia proporzionale alla distanza euclidea tra le coordinate colorimetriche. Lo spazio colore XYZ non è percettivamente uniforme. L'idea alla base dello spazio Lab consiste nel distorcere lo spazio XYZ con una funzione non lineare, al fine di renderlo percettivamente uniforme. Lo spazio colore Lab è composto da luminosità o

componente della luce (L^*) e da due componenti cromatiche: la componente a^*, che varia da verde a rosso, e la componente b^*, che varia da blu a giallo.

$$\begin{aligned} L^* &= 116\, f\left(\frac{Y}{Y_w}\right) - 16 \\ a^* &= 500\left[f\left(\frac{X}{X_w}\right) - f\left(\frac{Y}{Y_w}\right)\right] \\ b^* &= 200\left[f\left(\frac{Y}{Y_w}\right) - f\left(\frac{Z}{Z_w}\right)\right] \end{aligned} \tag{2.13}$$

dove X_w, Y_w e Z_w sono le coordinate del punto corrispondente al bianco, e $f(t)$ vale:

$$f(t) \triangleq \begin{cases} \sqrt[3]{t} & t > \left(\frac{6}{29}\right)^3 \\ \frac{841}{108}t + \frac{16}{116} & altrimenti \end{cases} \tag{2.14}$$

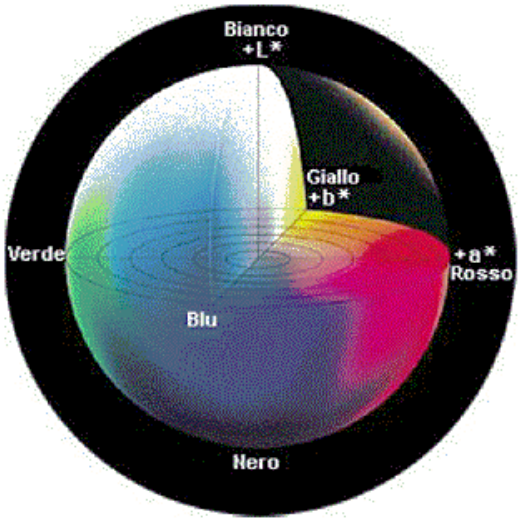


Figura 2.11: Diagramma di cromaticità Lab

Proprietà:

- L^* varia da 0 a 100;
- Ai grigi corrisponde $a^* = 0$ e $b^* = 0$;
- La distanza percepita tra due colori è data dalla loro distanza euclidea:

$$\Delta E \triangleq \sqrt{(L_2 - L_1)^2 + (a_2 - a_1)^2 + (b_2 - b_1)^2} \qquad (2.15)$$

Per convenzione, due colori appaiono indistinguibili quando $\Delta E \leq 1$.

Vantaggi:

- Consente di rappresentare quasi ogni colore visibile (perché è una trasformazione dello spazio XYZ);
- È "device independent" (cioè le coordinate rappresentano le proprietà fisiche del colore);
- Il rumore di quantizzazione è poco visibile.

Limitazioni:

- La codifica di a^* e b^* esclude alcuni colori visibili;
- La codifica è inefficiente (molti valori non corrispondono a colori visibili).

2.4.4 HSV

HSV (Hue: tonalità, Saturation: saturazione, Value: brillantezza) è basato sulla separazione tra la componente di luminanza e le componenti di crominanza. Nel modello HSV, il solido di riferimento è una piramide (a base esagonale o circolare) rovesciata, con il vertice nell'origine ($V = 0$) e con la base posta sul piano $V = 1$.

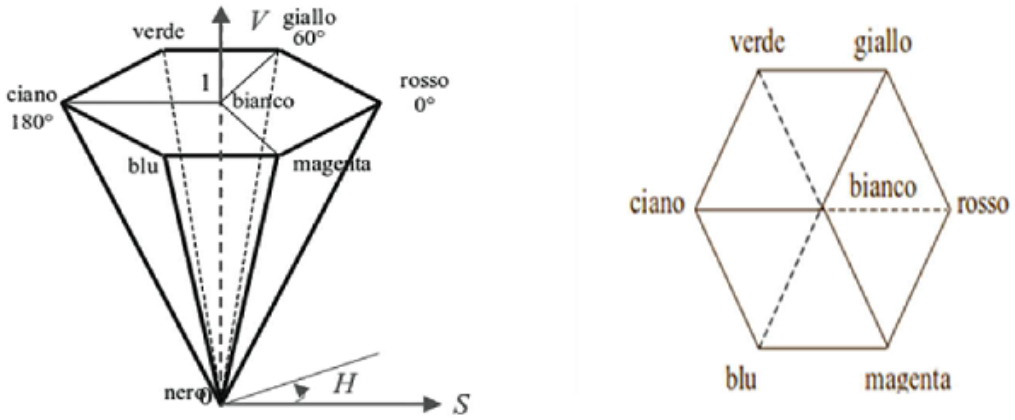


Figura 2.12: Piramide HSV

Dei tre parametri, H è la misura dell'angolo rispetto all'asse verticale, che varia convenzionalmente dal rosso primario a 0°, passando per il verde primario a 120° e il blu primario a 240°, e quindi tornando al rosso a 360°. Per saturazione, si intende l'intensità e la purezza della singola tonalità; S varia da 0 (sull'asse V) a 1 (sulla superficie della piramide). La luminosità V, infine, è un'indicazione della brillantezza del colore e anch'essa varia tra 0 (vertice della piramide), corrispondente al nero, e 1 (base della piramide), corrispondente al bianco. La scala dei grigi si trova, quindi, sull'asse V.

2.5 Mean–Shift Segmentation

Mean–Shift è una tecnica di clustering non–parametrica, ovvero non fa alcuna assunzione circa la forma della distribuzione dei dati in analisi. È stato quindi utile sfruttare questa tecnica per creare segmentare l'immagine in analisi in base al colore dei pixel.

Ipotizzando di lavorare con una distribuzione multivariata (caso reale), vogliamo andare a identificare i prototipi dei possibili cluster. Consideriamo quindi di avere a disposizione un dataset contenente i punti x_i, per $i = 1, \dots, n$, appartenenti a uno spazio d–dimensionale $\mathbb{R}^d$. Per prima cosa è necessario stimare la densità di probabilità, per poter poi individuare le mode presenti. Per la stima della densità di probabilità non parametrica useremo la tecnica Parzen Window. La probabilità che un vettore x cada in una regione $\mathcal{R}$ viene calcolata nel seguente modo:

$$P = \int_{\mathcal{R}} f(x')dx' \tag{2.16}$$

Avendo, nel nostro caso, n campioni e volendo calcolare la probabilità che k di questi cadano nella regione $\mathcal{R}$, sotto la condizione che $\{x_1, \dots x_n\}$ siano variabili aleatorie indipendenti e identicamente distribuite, possiamo stimare P con la frequenza relativa:

$$P \cong \frac{k}{n} \tag{2.17}$$

Se inoltre assumiamo che $f(x)$ sia continua e che la regione $\mathcal{R}$ sia talmente piccola da non permettere variazioni di f al suo interno, allora possiamo scrivere

$$\int_{\mathcal{R}} f(x')dx' \cong f(x)V \tag{2.18}$$

dove V è il volume racchiuso da $\mathcal{R}$. Combinando le (2.16), (2.17) e (2.18) si arriva infine alla seguente stima:

$$f(x) \cong \frac{k/n}{V} \tag{2.19}$$

Ci sono tuttavia alcuni problemi pratici e teorici nell'uso delle Parzen Window. Infatti, per fare in modo che la stima (2.18) sia corretta, è necessario che $V \to 0$; quindi la regione $\mathcal{R}$ può diventare talmente piccola da non avere alcun punto al suo interno ($k = 0$), producendo una stima $f(x) \cong 0$, che sarebbe inutile. Per ovviare a questo inconveniente, partizioniamo il feature space in tante regioni, $\mathcal{R}_1, \mathcal{R}_2, \mathcal{R}_3$ ..., contenenti uno o più punti. In particolare, il pedice individua il numero di campioni che cadono nella rispettiva regione: quindi $\mathcal{R}_1$ conterrà un solo dato, $\mathcal{R}_2$ ne conterrà due e così via. Indichiamo poi con V_n il volume relativo a $\mathcal{R}_n$, e sia k_n il numero di campioni che stanno in $\mathcal{R}_n$ e $f_n(x)$ la stima n–esima di $f(x)$

$$f_n(x) = \frac{k_n/n}{V_n} \tag{2.20}$$

Affinché $f_n(x) \to f(x)$ devono essere verificate tre condizioni

$$\lim_{n\to\infty} V_n = 0$$

$$\lim_{n\to\infty} k_n = \infty$$

$$\lim_{n\to\infty} \frac{k_n}{n} = 0$$

La prima condizione ci assicura che P/V convergerà a $f(x)$, la seconda condizione ci assicura che il rapporto frequenziale della (2.20) convergerà a P (per $f(x) \neq 0$), e la terza condizione è necessaria per la convergenza di $f_n(x)$. Nella Parzen Window, per ottenere regioni che soddisfino le precedenti condizioni, si calcola il volume come

funzione del numero di campioni $V_n = 1/\sqrt{n}$. Considerando che nello spazio delle features $\mathbb{R}^d$ il volume V_n, che racchiude la regione R_n, è caratterizzato da un ipercubo di lato h_n, avremmo quindi

$$V_n = h_n^d \tag{2.21}$$

Il numero k_n di campioni che cadono nell'ipercubo è dato dalla seguente funzione:

$$\varphi(\boldsymbol{u}) = \begin{cases} 1 & |u_j| \leq 1 \quad j = 1, \dots, d \\ 0 & altrimenti \end{cases} \tag{2.22}$$

che rappresenta una window function definita sull'ipercubo di lato unitario e centrato nell'origine. Se un campione x_i cade nell'ipercubo centrato in $\boldsymbol{x}$, allora $\varphi\left(\frac{(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x_i})}{h_n}\right) = 1$, 0 , altrimenti. Quindi, il numero di campioni k_n, può essere calcolato come:

$$k_n = \sum_{i=1}^{n} \varphi\left(\frac{\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x_i}}{h_n}\right) \tag{2.23}$$

Sostituendolo nell'equazione (2.20), si ottiene infine

$$f_n(\boldsymbol{x}) = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} \frac{1}{V_n} \varphi\left(\frac{\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x_i}}{h_n}\right) = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} \frac{1}{h_n^d} \varphi\left(\frac{\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x_i}}{h_n}\right) \tag{2.24}$$

L'equazione (2.24) esprime una stima di f, che indichiamo con f_n, come media di funzioni di $\boldsymbol{x}$ e di campioni $\boldsymbol{x_i}$. Infatti, il kernel φ rappresenta una funzione finestra usata per interpolare la distribuzione dei dati, ossia, ciascun campione contribuisce alla stima di f in accordo alla distanza da $\boldsymbol{x}$. Il profilo del kernel deve soddisfare

$$K(\boldsymbol{x}) = c_{k,d} k(\|\boldsymbol{x}\|^2) \tag{2.25}$$

dove $c_{k,d}$ è una costante che serve per assicurare che $K(\boldsymbol{x})$ integri a 1 e in cui $k(\cdot)$ può essere ad esempio un Kernel Gaussiano o di Epanechnikov. Riscrivendo la (2.24) usando l'equazione (2.25) otteniamo infine

$$f_n(\boldsymbol{x}) = \frac{c_{k,d}}{nh^d}\sum_{i=1}^{n} k\left(\left\|\frac{\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x_i}}{h}\right\|^2\right) \tag{2.26}$$

Poiché siamo interessati a ricercare le mode della distribuzione f andremo a valutare dove il gradiente ∇f

$$\nabla f_n(\boldsymbol{x}) = \frac{2c_{k,d}}{nh^{d+2}}\sum_{i=1}^{n}(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x_i})k'\left(\left\|\frac{\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x_i}}{h}\right\|^2\right) \tag{2.27}$$

si annulla. Definendo la funzione $g(x) = -k'(x)$ possiamo riscrivere la (2.27) nel seguente modo

$$\nabla f_n(\boldsymbol{x}) = \frac{2c_{k,d}}{nh^{d+2}}\sum_{i=1}^{n}(\boldsymbol{x_i}-\boldsymbol{x})g\left(\left\|\frac{\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x_i}}{h}\right\|^2\right)$$

$$= \frac{2c_{k,d}}{nh^{d+2}}\left[\sum_{i=1}^{n} g\left(\left\|\frac{\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x_i}}{h}\right\|^2\right)\right]\left[\frac{\sum_{i=1}^{n}\boldsymbol{x_i}g\left(\left\|\frac{\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x_i}}{h}\right\|^2\right)}{\sum_{i=1}^{n} g\left(\left\|\frac{\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x_i}}{h}\right\|^2\right)} - \boldsymbol{x}\right] \tag{2.28}$$

Il primo termine è proporzionale alla stima della densità f in $\boldsymbol{x}$, mentre il secondo è il vettore del mean shift $\boldsymbol{m_h}(\boldsymbol{x})$.

Condizione sufficiente per la convergenza dell'algoritmo è data dal seguente teorema: Se il kernel K ha un profilo convesso e monotonamente decrescente, le sequenze di nuovi centri del kernel $\{\boldsymbol{y_j}\}_{j=1,2,\dots}$ ed i rispettivi valori della funzione densità $\{f(\boldsymbol{y_j})\}_{j=1,2,\dots}$ convergono. La sequenza $\{f(\boldsymbol{y_j})\}_{j=1,2,\dots}$ è monotonamente crescente.

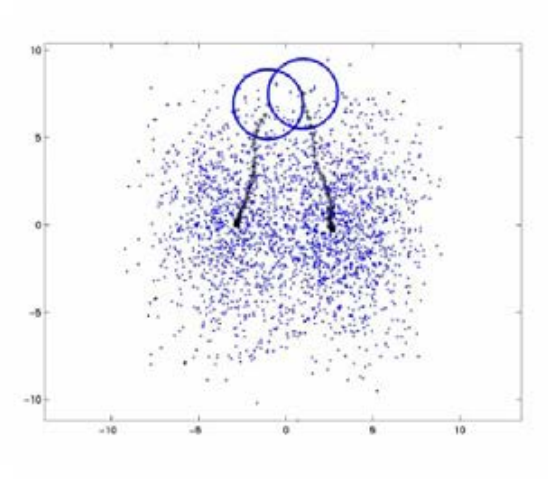


Figura 2.13: Ricerca della moda con Mean–Shift

In *Figura 2.13* si può vedere come funziona la ricerca della moda in Mean–Shift: dato un insieme di punti, si selezionano dei punti qualsiasi dal dataset; il Mean–Shift inizia a stimare la posizione successiva nella direzione in cui f aumenta, fino ad arrivare al valore in cui il gradiente si annulla.

Quindi la procedura di Mean–Shift si può riassumere come segue:

1. Siano dati i campioni da cui calcolare le mode, $\boldsymbol{x}_i$ per $i = 1, \dots, n$
2. **repeat**
3. $\boldsymbol{y}_{old} \leftarrow random(\boldsymbol{x}_i)$ Seleziona casualmente un punto iniziale dal dataset
4. **repeat**
5. Calcola il successivo valore centrale del kernel

$$\boldsymbol{y}_{new} = \frac{\sum_{i=1}^{n} \boldsymbol{x}_i exp\left(\left\|\frac{\boldsymbol{y}_{old} - \boldsymbol{x}_i}{h}\right\|^2\right)}{\sum_{i=1}^{n} exp\left(\left\|\frac{\boldsymbol{y}_{old} - \boldsymbol{x}_i}{h}\right\|^2\right)}$$

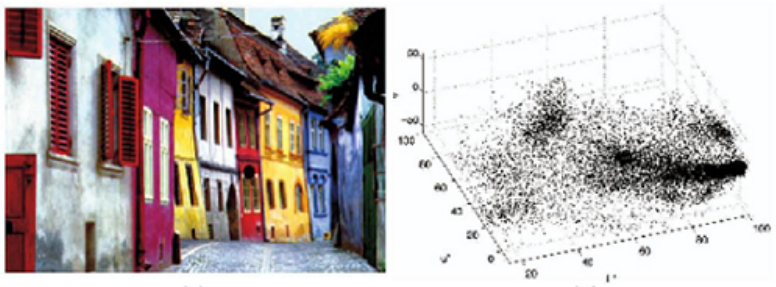
6. **if** $\|\boldsymbol{y}_{new} - \boldsymbol{y}_{old}\| < \varepsilon$ **then**
7. **break**

8. **else**
9. $\boldsymbol{y}_{old} = \boldsymbol{y}_{new}$
10. **end if**
11. **until** $\|\boldsymbol{y}_{new} - \boldsymbol{y}_{old}\| < \varepsilon$
12. **until** sono stati visitati tutti i campioni $\boldsymbol{x}_i$

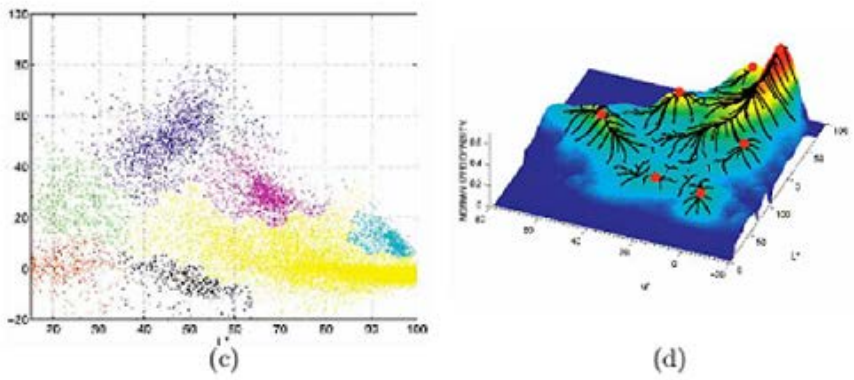
Sfruttando quindi Mean–Shift si può segmentare un'immagine a colori usando informazione congiunta tra colore e posizione dei pixel nell'immagine. In particolare, l'informazione del pixel $\boldsymbol{x}_s(x, y)$, che è indicato come dominio spaziale, è concatenata con quella di colore $\boldsymbol{x}_r$, che spesso è una terna appartenente ad uno spazio colore qualsiasi. L'algoritmo Mean–Shift è quindi applicato al dominio $5D$. Poiché vi possono essere differenze di scala tra il dominio di colore e quello spaziale, il kernel risultante è modificato in maniera opportuna

$$K(\boldsymbol{x}_j) = k\left(\frac{\|\boldsymbol{x}_r\|^2}{h_r^2}\right) k\left(\frac{\|\boldsymbol{x}_s\|^2}{h_s^2}\right) \tag{2.29}$$

in cui vengono usati due raggi differenti h_r e h_s per controllare il comportamento del filtro composto. Inoltre si può inserire un ulteriore parametro M, che permette di eliminare regioni che hanno un numero di pixel inferiore a M.



(a) (b)



(c) (d)

Figura 2.14: Immagine 400×276 in (a) e corrispondenti punti nello spazio Luv (b). In (c) il risultato del clustering con il Mean–Shift e, in (d), la sua densità e le mode trovate

2.6 Edge Detection – Filtro di Sobel

I contorni (edge, in Inglese) sono associati a caratteristiche locali delle immagini e contengono informazioni importanti per operazioni quali la segmentazione, la descrizione degli oggetti, il template matching, il tracking etc. Gli edge ([7] *cap. 4.2.1*) altro non sono che pixel che si trovano al confine di due regioni che hanno intensità (più in generale, caratteristiche visive) differenti. Quindi la rilevazione di questo tipo di feature è stata molto importante al fine di verificare la presenza di colonie batteriche all'interno delle piastre di Petri.

In una dimensione, la transizione da un livello di grigio ad un altro evidenzia un picco nella derivata, raggiungendo il massimo nel punto di flesso. Ne consegue quindi che il modo più semplice per rilevare un edge è effettuare un'operazione di thresholding sulla derivata.

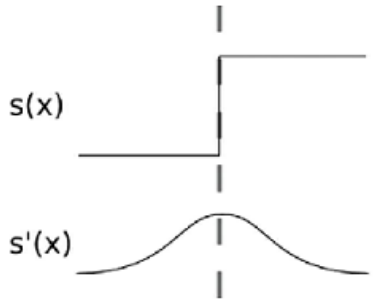


Figura 2.15: 1D Step Edge

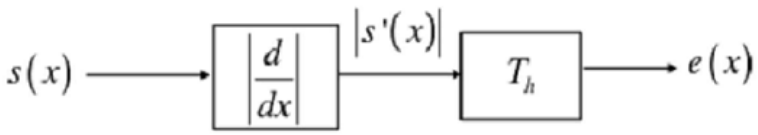


Figura 2.16: Procedura di rilevazione edge 1D

Tuttavia, la rilevazione degli edge è influenzata non soltanto dall'intensità ma anche dalla direzione (verticale, orizzontale o diagonale) del contorno. Usando

l'operatore gradiente siamo quindi in grado di rilevare il contorno qualunque sia la sua direzione.

$$\nabla I(x,y) = \begin{bmatrix} \frac{\delta I(x,y)}{\delta x} \\ \frac{\delta I(x,y)}{\delta y} \end{bmatrix} \tag{2.30}$$

La direzione del gradiente ci restituisce la direzione in cui la funzione ha la massima variazione, mentre l'ampiezza ci fornisce il valore assoluto della derivata lungo quella direzione. Volendo calcolare il modulo del gradiente a partire dalle derivate parziali I_x e I_y è sufficiente calcolare $\sqrt{I_x^2 + I_y^2}$.

Nella *Figura 2.17* è descritto il metodo di rilevazione degli edge attraverso il thresholding del gradiente, dove l'angolo θ indica la direzione del contorno.

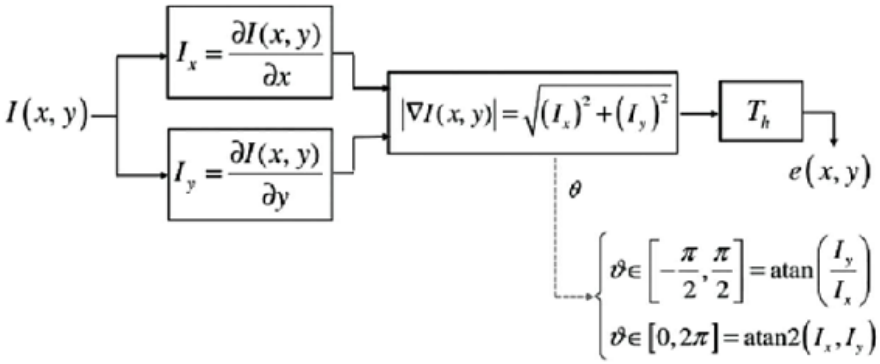


Figura 2.17: Sogliatura del gradiente

È possibile approssimare il gradiente usando uno dei seguenti metodi (che possiamo pensare come correlazioni fra l'immagine e i seguenti kernel, con evidenziate le origini):

- Backward Difference:

$$\frac{\delta I(x,y)}{\delta x} = I_x(i,j) = I(i,j) - I(i,j-1)$$
$$\frac{\delta I(x,y)}{\delta y} = I_y(i,j) = I(i,j) - I(i-1,j) \quad (2.31)$$

$$[-1 \quad 1] \qquad \begin{bmatrix} -1 \\ 1 \end{bmatrix}$$
$$(0,0)$$

- Forward Difference:

$$\frac{\delta I(x,y)}{\delta x} = I_x(i,j) = I(i,j+1) - I(i,j)$$
$$\frac{\delta I(x,y)}{\delta y} = I_y(i,j) = I(i+1,j) - I(i,j) \quad (2.32)$$

$$[-1 \quad 1] \qquad \begin{bmatrix} -1 \\ 1 \end{bmatrix}$$
$$(0,0)$$

- Central Difference:

$$\frac{\delta I(x,y)}{\delta x} = I_x(i,j) = I(i,j+1) - I(i,j-1)$$
$$\frac{\delta I(x,y)}{\delta y} = I_y(i,j) = I(i+1,j) - I(i-1,j) \quad (2.33)$$

$$[-1 \quad 0 \quad 1] \qquad \begin{bmatrix} -1 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix}$$
$$(0,0)$$

Nella realtà, i contorni non sono netti, ma sono affetti da rumore, che causa picchi spuri che possono complicare notevolmente l'operazione di rilevamento degli edge. Servono dunque operatori robusti al rumore, che siano in grado di filtrare le componenti causate da esso. Una tecnica per eliminare il rumore può essere quella di realizzare lo smoothing dell'immagine prima di rilevarne i contorni. Tale operazione ha però l'effetto di introdurre una sfocatura che rende più difficile la rilevazione accurata degli edge. Il problema può tuttavia essere evitato eseguendo lo smoothing e il calcolo delle derivate in un unico passo.

In letteratura esistono vari operatori che consentono di effettuare questa operazione, uno dei quali è l'operatore di Sobel che approssima il gradiente utilizzando la central difference, pesando maggiormente il pixel centrale per aumentare l'isotropicità (proprietà d'indipendenza dalla direzione). Utilizzando il filtro di Sobel, si definisce dunque:

$$I_x(i,j) = \frac{1}{4}[I(i,j-1) + 2I(i,j) + I(i,j+1)]$$
$$I_y(i,j) = \frac{1}{4}[I(i-1,j) + 2I(i,j) + I(i+1,j)] \quad (2.34)$$

da cui

$$\widetilde{I_x}(i,j) = I_y(i,j+1) - I_y(i,j-1)$$
$$\widetilde{I_y}(i,j) = I_x(i+1,j) - I_x(i-1,j) \quad (2.35)$$

con i relativi kernel:

$$\begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix}$$

2.7 Thresholding con il metodo di Otsu

In computer vision e image processing il metodo di Otsu [15] è usato per realizzare il clustering dell'immagine basato sul thresholding dell'istogramma dell'immagine stessa in scala di grigi. Assumendo quindi che l'immagine contenga due classi di pixel, che seguono un istogramma bimodale, si cerca di determinare la migliore soglia S che separi le due classi. Il metodo di Otsu si basa sull'approssimazione dell'istogramma dell'immagine usando la media pesata di due densità di probabilità con distribuzione normale. Dall'istogramma dell'immagine $H(l)$ si deriva l'istogramma normalizzato dato da

$$p(l) = \frac{H(l)}{\sum_{i=0}^{255} H(i)} \; con \; l = 0, \dots, 255 \qquad (2.36)$$

che rappresenta la probabilità di occorrenza di ogni livello di grigio l. Per ogni valore scelto della soglia S sono individuati due gruppi di pixel, rispettivamente della prima e della seconda classe, i cui istogrammi dei livelli di grigio l sono approssimati con due distribuzioni normali $N(\mu 1, \sigma 1)$ ed $N(\mu 2, \sigma 2)$.

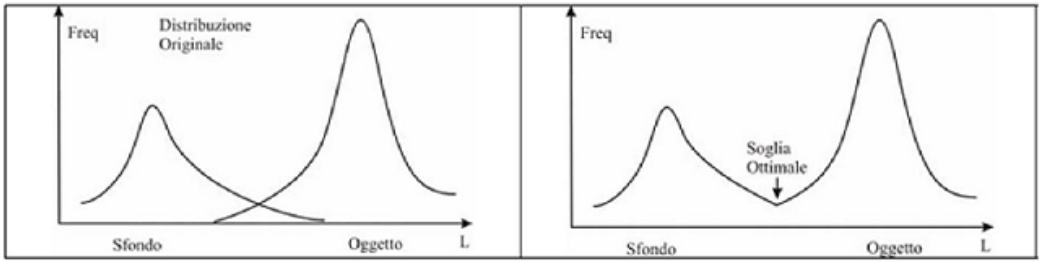


Figura 2.18: Determinazione della soglia ottimale S

La soglia S è scelta con un livello di grigio corrispondente alla minima probabilità $p(s)$ tra i picchi delle due distribuzioni normali, e conseguentemente si ha una segmentazione con il minimo errore, ossia si ha il numero minimo di pixel non appartenenti all'oggetto, oppure allo sfondo. Ogni valore di soglia S determina due varianze, una per i livelli di grigio minori di S ed una per quelli maggiore di S. Il metodo di thresholding ottimale introdotto da Otsu cerca la soglia andando a minimizzare la somma pesata delle varianze (within–group) tra i due gruppi, usando come pesi le probabilità dei rispettivi gruppi. Ciascun gruppo dovrebbe avere una distribuzione unimodale a forma di campana (approssimabile ad una Gaussiana), una distribuita attorno ad una media più bassa e una attorno ad una media più alta. Questo implica che vi è una relazione di omogeneità dei livelli di grigio appartenenti ad ogni raggruppamento. Si può usare la varianza come misura di omogeneità: un raggruppamento con alta omogeneità avrà una varianza bassa e, viceversa, a una bassa omogeneità corrisponderà una varianza alta. Per calcolare la soglia di segmentazione per i due gruppi è necessario garantire una varianza tra gruppi minima o, in alternativa, massimizzare la differenza tra le medie dei due gruppi.

Indichiamo con $\sigma_W^2(S)$ la somma pesata delle varianze dei gruppi, ovvero la within–group variance. Sia $\sigma_1^2(S)$ la varianza del gruppo con livelli di grigio inferiori ad S, e $\sigma_2^2(S)$ quella relativa al gruppo avente livelli di grigio superiori ad S. In corrispondenza di una soglia S, la probabilità che un pixel appartenga al primo gruppo oppure al secondo è data da:

$$q_1(S) = \sum_{i=0}^{S} p(l) \quad q_2(S) = \sum_{i=S+1}^{255} p(l) = 1 - q_1(S) \qquad (2.37)$$

Con $\mu_1(S)$ e $\mu_2(S)$ indichiamo, rispettivamente, le medie del primo e del secondo gruppo generate dalla soglia S, di seguito definite:

$$\mu_1(S) = \frac{\sum_{i=o}^{S} lp(l)}{q_1(S)}$$
$$\mu_2(S) = \frac{\sum_{i=S+1}^{255} lp(l)}{q_2(S)} \quad (2.38)$$

Possiamo quindi calcolare le varianze

$$\sigma_1^2(S) = \frac{\sum_{i=0}^{S}\big(l-\mu_1(S)\big)^2 p(l)}{q_1(S)} \qquad \sigma_2^2(S) = \frac{\sum_{i=S+1}^{255}\big(l-\mu_2(S)\big)^2 p(l)}{q_2(S)} \quad (2.39)$$

che dipendono solo dalla soglia S. La varianza within–group $\sigma_W^2(S)$ è definita come:

$$\sigma_W^2(S) = q_1(S)\sigma_1^2(S) + q_2(S)\sigma_2^2(S) \quad (2.40)$$

La migliore soglia può essere ottenuta mediante un metodo di ricerca sequenziale, attraverso tutti i possibili valori di S che minimizzano $\sigma_W^2(S)$. Vi è una relazione tra la varianza $\sigma_W^2(S)$ e quella totale σ^2, indipendente da S e definita da:

$$\sigma^2 = \sum_{i=0}^{255}(l-\mu)^2 p(l) \quad (2.41)$$

dove $\mu = \sum_{i=0}^{255} lp(l)$. La relazione tra le due varianze rende il calcolo della soglia ottimale computazionalmente meno complesso. Riscrivendo la σ^2 otteniamo infatti:

$$\sigma^2 = \sum_{i=0}^{S}(l-\mu_1(S)+\mu_1(S)-\mu)^2 p(l)$$

$$+\sum_{i=S+1}^{255}(l-\mu_2(S)+\mu_2(S)-\mu)^2 p(l) = \qquad (2.42)$$

$$=\sum_{i=0}^{S}\{[l-\mu_1(S)]^2+2[l-\mu_1(S)][\mu_1(S)-\mu]+[\mu_1(S)-\mu]^2\}p(l)+$$

$$+\sum_{i=S+1}^{255}\{[l-\mu_2(S)]^2+2[l-\mu_2(S)][\mu_2(S)-\mu]+[\mu_2(S)-\mu]^2\}p(l)$$

e considerando che

$$\sum_{i=0}^{S}\{[l-\mu_1(S)][\mu_1(S)-\mu]\}p(l)=0$$

$$\sum_{i=S+1}^{255}\{[l-\mu_2(S)][\mu_2(S)-\mu]\}p(l)=0$$

possiamo ottenere:

$$\sigma^2 = \sum_{i=0}^{S} [l - \mu_1(S)]^2 p(l) + [\mu_1(S) - \mu]^2 q_1(S) + \\ + \sum_{i=S+1}^{255} [l - \mu_2(S)]^2 p(l) + [\mu_2(S) - \mu]^2 q_2(S) = \\ = [q_1(S)\sigma_1^2(S) + q_2(S)\sigma_2^2(S)] + \{[\mu_1(S) - \mu]^2 q_1(S) + [\mu_2(S) - \mu]^2 q_2(S)\} \quad (2.43)$$

Il primo termine in (2.43) è la varianza within–group $\sigma_W^2(S)$ definita sopra, mentre il secondo termine è la varianza tra i gruppi (between–group) che indichiamo con $\sigma_B^2(S)$. Quest'ultima è la somma pesata del quadrato delle distanze tra la media di ciascun gruppo e la media totale. La media totale può essere scritta come:

$$\mu = q_1(S)\mu_1(S) + q_2(S)\mu_2(S) \quad (2.44)$$

Semplificando la (2.43), eliminando μ e sostituendo $q_2(S)$ con $1 - q_1(S)$ si ha, infine:

$$\sigma^2 = \sigma_W^2(S) + q_1(S)[1 - q_1(S)][\mu_1(S) - \mu_2(S)]^2 \quad (2.45)$$

Dal momento che la varianza totale non dipende dalla soglia S, la soglia che minimizza σ_W^2 è quella che massimizza la between–group variance $\sigma_B^2(S)$

$$\sigma_B^2(S) = q_1(S)[1 - q_1(S)][\mu_1(S) - \mu_2(S)]^2 \quad (2.46)$$

Vi è una stretta relazione tra il valore di soglia calcolato tra un istante ed il successivo.

separare il background dalle tipologie di infezione che si presentano con colorazione gialla.

3 Realizzazione di un sistema automatico per la conta batterica

In questo capitolo vengono illustrate le fasi implementative del software per il riconoscimento automatico delle infezioni urinarie, da urinocoltura su piastra di Petri, e per la relativa conta batterica.

3.1 Qt Creator

Qt è l'ambiente di sviluppo software di Nokia basato su un insieme di librerie multipiattaforma e multipurpose; le librerie di Qt spaziano dalla gestione delle GUI fino a quelle per l'accesso a database, passando per network, animazioni e multithread. Giunto ormai alla versione 5.3.1 (originariamente era stato sviluppato dalla Norvegese Trolltech, acquistata poi da Nokia nel 2008) permette lo sviluppo di applicazioni per MS Windows, UNIX/Linux, Mac OS X, Embedded Linux, Windows CE/Mobile, Symbian e presto anche Maemo. I linguaggi di programmazione più comunemente impiegati sono C++ e Python. Sono inoltre disponibili diversi binding per altri linguaggi.

I principali moduli messi a disposizione da Qt sono i seguenti:

- **QtCore**: modulo fondamentale, non ha funzioni grafiche
  - Container (liste, hash, set..)
  - QObject (base dell'object model di Qt)
  - Event loop
- **QtGui**: widget, model/view, QgraphicsView...
- **QtNetwork**: astrazione di protocolli di rete (come http)
- **QtSql**: accesso database
- **QtScript**: binding di oggetti Qt in Javascript
- **QtDeclarative**: libreria per costruire UI per dispositivi mobili a partire da un linguaggio declarative (QML) e JavaScript
- **QtXML**, **QtOpenGl**,**QtSvg** ...

3.2 Libreria OpenCV

OpenCV (Open Source Computer Vision Library) è una libreria open–source, rilasciata sotto licenza BSD, che include centinaia di algoritmi di computer vision. La libreria è realizzata in C++, come la sua API primaria, anche se esistono interfacce per altri linguaggi di programmazione, quali C, Python, Java e MATLAB.

Il framework OpenCV nasce da una iniziativa dell'Intel. Infatti, mentre i tecnici lavoravano ai miglioramenti delle CPU per applicazioni intensive (ad esempio ray–tracing in tempo reale e proiezione 3D), vennero a conoscenza del fatto che in molte università, in particolare al MIT Media Lab, era stata sviluppata una infrastruttura per la computer vision il cui codice veniva passato da studente a studente. Venne quindi deciso di implementare, a partire da questo codice, un framework per la computer vision per i processori Intel. Il progetto fu avviato, con la collaborazione di un team Intel russo,

nel 1999. La prima release ufficiale di OpenCV risale invece al 2006. Nel 2011 è stata rilasciata la versione 2.2.0, che per la prima volta estendeva il supporto anche ad Android. Al momento della scrittura di questa tesi l'ultima versione rilasciata è la 2.4.9.

OpenCV ha una struttura modulare, i cui principali moduli sono:

- **Core** – definisce le strutture dati primarie (es. Mat) e le funzioni di base utilizzate da tutti gli altri moduli.
- **Imgproc** – modello di image processing che include filtri lineari e non lineari, trasformazioni geometriche, conversione tra spazi colore, istogrammi e altro.
- **Video** – modulo di analisi video che include motion detection, sottrazione del background e algoritmi di tracciamento degli oggetti.
- **Calib3d** – algoritmi geometrici di base, calibrazione della videocamera, algoritmi 3D...
- **Features2d** – riconoscitore di features salienti.
- **Objdetect** – riconoscimento di oggetti (facce, occhi, persone, automobili, etc.).
- **Highgui** – interfaccia per l'acquisizione video, codec per immagini e video, etc.
- **Gpu** – algoritmi che supportano l'accelerazione tramite GPU.

3.3 Struttura del software

Le principali funzionalità del software sviluppato sono le seguenti:

- Interfaccia grafica e acquisizione video
- Rilevamento di movimenti
- Identificazione piastra e salvataggio immagine
- Identificazione e rimozione terreno di coltura
- Estrazione automatica del dataset di colonie
- Addestramento classificatore
- Riconoscimento colonie e conta batterica
- Verifica e salvataggio dei risultati

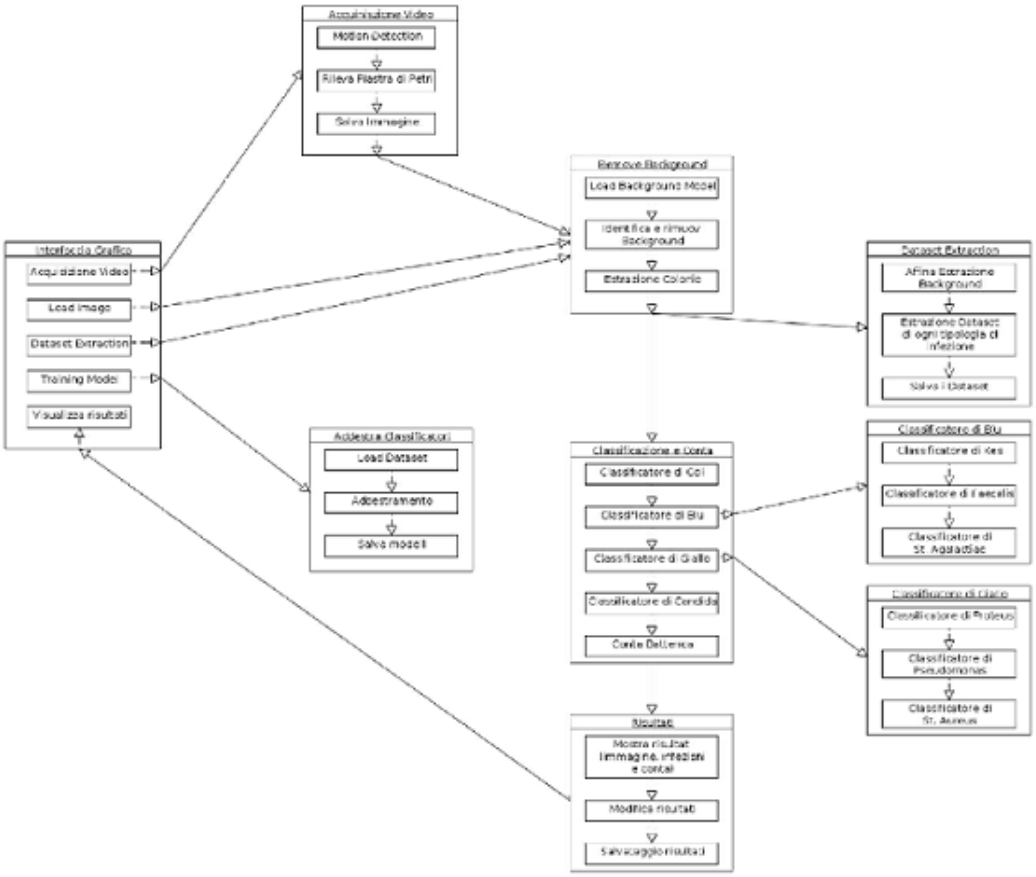


Figura 3.1: Struttura del Software

Come già preannunciato nell'Introduzione, in questa tesi verrà descritta la fase di acquisizione dell'immagine e, successivamente e in maniera più dettagliata, il lavoro che ha portato allo sviluppo del procedimento di identificazione e rimozione del terreno di coltura. Inoltre verrà illustrato come, attraverso questa funzionalità, sia stato possibile sviluppare una procedura automatica per l'estrazione dei dataset contenenti solo colonie batteriche. Le successive fasi, di addestramento del classificatore e di riconoscimento e conta delle colonie batteriche, oggetto precipuo della tesi di Paolo Andreini, verranno qui solo brevemente introdotte e verranno mostrati i risultati ottenuti utilizzando un semplice sistema di classificazione.

3.4 Interfaccia grafica

Utilizzando QtCreator, è stata creata una semplice interfaccia grafica, che permette di effettuare l'acquisizione tramite webcam oppure di caricare un'immagine precedentemente salvata. Dovendo lavorare con infezioni batteriche e non potendo avere a disposizione campioni acquisiti in tempo reale durante l'intera fase di sviluppo del software, è stato utile inserire la funzionalità di load, al fine di poter lavorare con un dataset di immagini precedentemente acquisite. Inoltre, è stata inserita la possibilità di selezionare un nuovo insieme di immagini dal quale estrarre i dataset delle varie tipologie di infezione e successivamente riaddestrare il classificatore delle colonie batteriche sui nuovi dati.

Figura 3.2: Interfaccia Grafica

3.5 Acquisizione video e rilevazione della piastra

Per prima cosa, il software mette a fuoco l'immagine catturata dalla webcam e ne setta alcune proprietà (dimensione 800×600). Vengono poi catturati i singoli frame dallo stream video e visualizzati nell'interfaccia grafica. L'obiettivo di questa fase è quello di andare a elaborare e salvare l'immagine solo quando la piastra è ferma sul supporto. A questo scopo, è stato utilizzato un semplice algoritmo di motion detection basato sulla differenza tra frame corrente e frame precedente.

Innanzitutto viene definita la regione su cui andare a rilevare il movimento (evidenziata in rosso in *Figura 3.3*); viene infatti eliminata quella parte dell'immagine in cui la presenza di movimento non è ritenuta significativa, in quanto esterna al supporto.

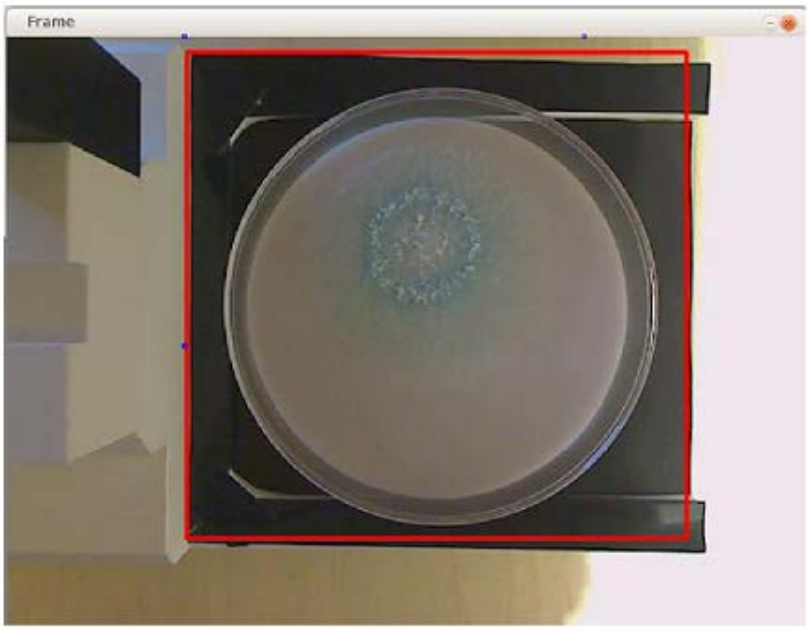


Figura 3.3 Area di rilevamento piastra

Si calcola quindi la differenza fra il frame attuale e il frame precedente (in scala di grigio) e sul risultato si applica un threshold per impostare a 0 tutti i pixel con valore inferiore a una certa soglia. Successivamente si applica un filtro morfologico (opening) con lo scopo di ridurre gli eventuali rumori (spike isolati) introdotti dalla videocamera. Se l'immagine risultante non contiene pixel con valore maggiore di 0 si assume che non vi sia movimento. Solo quando il sistema non rileva movimento si procede alla ricerca della regione circolare corrispondente alla piastra.

Per il rilevamento della piastra, è stata utilizzata la trasformata di Hough per evidenziarne il contorno circolare. In una prima fase, l'immagine (frame corrente del video) viene trasformata in scala di grigo; viene poi applicato un filtro mediano, in modo da eliminare il rumore e allo stesso tempo mantenere i dettagli (es. edge) inalterati. Sull'immagine risultante si procede poi alla ricerca delle forme circolari sfruttando la trasformata di Hough.

Se non viene rilevata la presenza di circonferenze, oppure se il raggio del cerchio rilevato non appartiene al range tipico di una piastra di Petri (175 – 200 pixel) o non rientra nella regione di acquisizione definita precedentemente (*Figura 3.3*), il software continua a mostrare il frame attuale catturato dalla telecamera. Invece, nel caso in cui la trasformata di Hough restituisca un cerchio di dimensioni e posizione adeguate, si procede al taglio della regione esterna alla piastra. L'immagine ottenuta viene salvata

in formato PNG e infine mostrata a video. Il software continuerà a visualizzarla finché verrà rilevata la presenza della piastra.

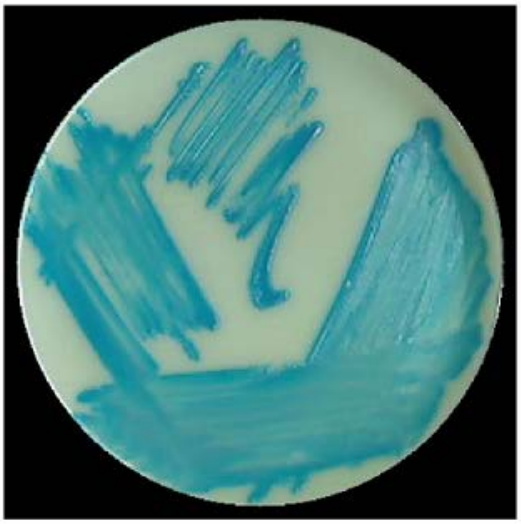


Figura 3.4: Piastra salvata dopo l'elaborazione

L'immagine della piastra ottenuta tramite acquisizione, oppure caricata tramite l'apposita funzione di load, viene quindi mandata in ingresso al modulo successivo.

3.6 Identificazione e rimozione del terreno di coltura

La rimozione del terreno di coltura presente all'interno delle piastre consente di isolare le colonie batteriche; questo semplifica sia la fase di classificazione e conta batterica che quella di estrazione automatica dei dataset da usare per l'addestramento dei classificatori. Per imparare a riconoscere il terreno sarà necessario costruirne un modello a partire da un insieme di immagini di riferimento contenenti solo background. A questo scopo, in prima istanza, si è proceduto alla rimozione delle colonie. In questa fase, non essendo ancora in grado di identificare automaticamente né le colonie né il terreno è stato necessario eseguire la procedura manualmente.

3.6.1 Estrazione manuale dei dataset

Il dataset di immagini è stato fornito dalla Diesse Ricerche che, sfruttando le funzionalità di acquisizione descritte nel precedente paragrafo, ha fotografato piastre di Petri su cui erano stati precedentemente seminati campioni di urina, utilizzando la tecnica dello striscio sul terreno di coltura Uriselect 4. Il dataset è composto da 236 immagini, raccolte scattando in media 3/4 foto di 72 piastre in posizioni e condizioni di luce differenti; inoltre, sono state fornite altre 33 immagini di piastre fotografate una sola volta. Il totale delle immagini a disposizione è quindi 269. Avere più foto di una stessa piastra è stato utile perché, seppur contenendo le stesse colonie, nei diversi scatti le condizioni ambientali erano sempre diverse. Al fine di valutare le reali prestazioni del modello, si è deciso di suddividere il dataset nel seguente modo:

- Training set: 72 immagini
- Validation set: 164 immagini (foto in posizioni differenti delle 72 usate in fase di training)
- Test set: 33 immagini (piastre catturate in una sola posizione e quindi mai viste in addestramento)

Contrariamente a quanto avviene normalmente, il training set è di dimensioni inferiori al validation set; durante la fase di progettazione del modulo di classificazione,

tuttavia, i dataset verranno estratti automaticamente, sfruttando la procedura descritta nei paragrafi successivi e, sostanzialmente, verranno "scambiati". Avendo, infatti, a disposizione un unico dataset, di dimensioni piuttosto limitate, eviteremo di addestrare e testare il modello per il rilevamento del background sulle stesse immagini.

Oltre a quello dei background, è stato anche necessario estrarre un dataset contenente immagini di infezioni di tipo Candida e un dataset con all'interno immagini delle tre tipologie di colonie che si caratterizzano per una colorazione gialla:

- Dataset Background: dal training set sono state evidenziate manualmente le regioni rappresentanti lo sfondo, usate poi per estrarre i dati necessari alla costruzione del modello di riferimento. I vari modelli sono stati provati sul validation set e infine testati sul test set.

- Dataset Giallo: dalle 72 immagini del training set sono state prese in considerazione solo le 14 contenenti colonie che si manifestano in una tonalità di giallo (Pseudomonas, Staphylococcus Aureus, Proteus). Per ogni immagine, è stata estratta manualmente la regione contenente le colonie.
- Dataset Candida: dalle 72 immagini del training set sono state prese in considerazione solo le 13 contenenti colonie di Candida. Per ogni immagine è stata estratta manualmente la regione contenente le colonie.

3.6.2 Modello del Background

In prima analisi, l'idea più semplice è stata quella di costruire un modello statistico calcolando, sul training set, media e varianza delle componenti cromatiche dei pixel di terreno e utilizzandole per definire una regione (sfera o cubo) che lo rappresentasse. Usando questo modello per rilevare il terreno nelle immagini del validation set i risultati prodotti si sono rivelati insoddisfacenti. Si può capire il motivo di tale comportamento, andando a visualizzare come sono distribuiti i pixel che caratterizzano il terreno all'interno del cubo RGB.

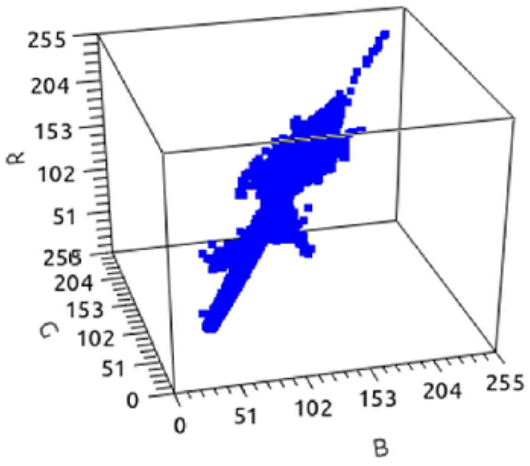


Figura 3.5: Distribuzione dei colori di background all'interno del cubo RGB

Come si può vedere in *Figura 3.5*, in RGB non è possibile andare a rilevare esattamente una regione (o più regioni), in quanto i colori tipici dello sfondo non sono ben raggruppati; seppure, quindi, per l'occhio umano questi colori sembrino molto simili, nello spazio RGB risultano caratterizzati da una variabilità molto elevata.

Basandosi su quest'ultima osservazione, abbiamo provato a rappresentare i valori dei pixel di background negli spazi di colore HSV e Lab, tralasciando la componente di luminosità (componente L in Lab e componente V in HSV). Le regioni così ottenute sono rappresentate in *Figura 3.6*:

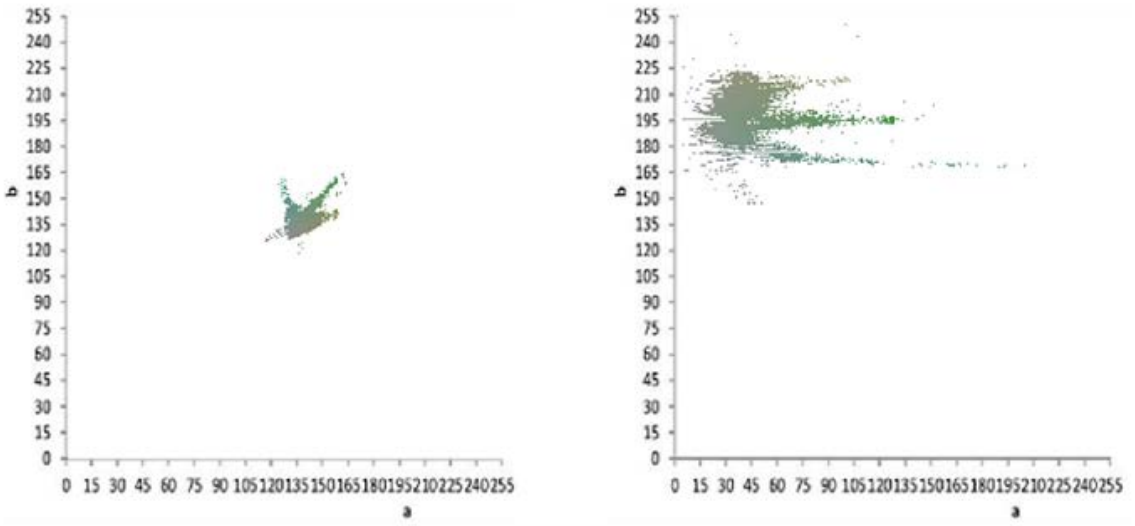


Figura 3.6: A sinistra la distribuzione dei colori nello spazio (a,b), a destra nello spazio (H,S)

A causa dell'eliminazione manuale delle colonie dal dataset Background, è possibile che nelle immagini rimangano alcuni pixel con colori non tipici del terreno di coltura, che vanno quindi ad alterare la regione identificata in *Figura 3.6*. Per ovviare al problema, è stata calcolata la concentrazione di ogni pixel di sfondo presente nel dataset sia nello spazio (a, b) che nello spazio (H, S). Sfruttando questa informazione, sono stati quindi eliminati i pixel a bassa concentrazione, ottenendo così regioni più compatte.

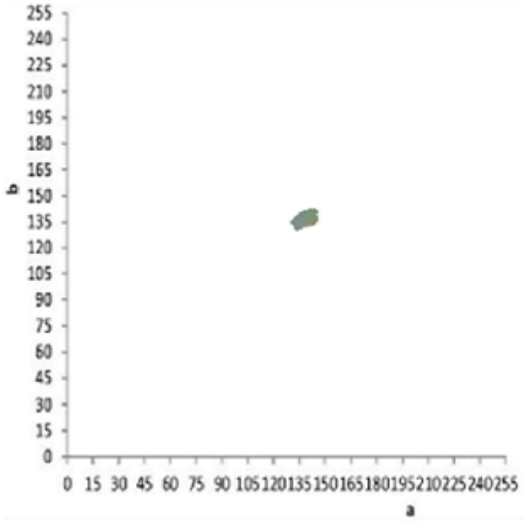


Figura 3.7: Distribuzioni dei colori di background nello spazio (a,b) dopo l'eliminazione dei pixel in base alla concentrazione

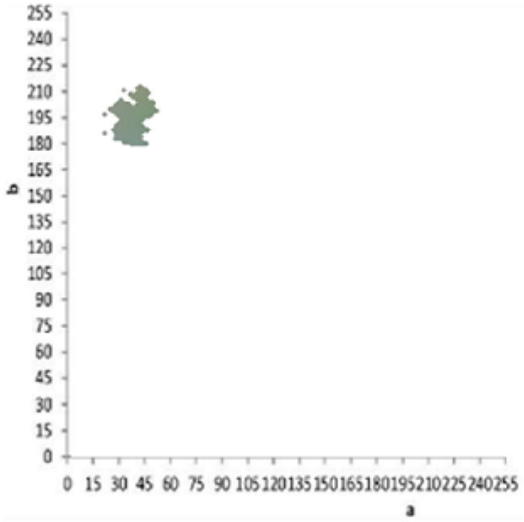


Figura 3.8: Distribuzioni dei colori di background nello spazio (H,S) dopo l'eliminazione dei pixel in base alla concentrazione

Come mostrato in *Figura 3.7*, nello spazio (a,b) la regione identificata è molto più compatta sia rispetto all'RGB che all'HSV; lo spazio di colori Lab è infatti costruito proprio con l'obiettivo di riprodurre al meglio le differenze percepite dall'occhio umano (percettivamente uniforme).

Usando questo modello, in fase di identificazione i risultati sono stati nettamente migliori ma ancora non soddisfacenti. Purtroppo, infatti, alcuni colori tipici del terreno risultano essere anche tipici di alcune colonie. In particolare, questo succede con le infezioni di Candida e Pseudomonas, ma più in generale con tutte e tre le tipologie di infezioni che si manifestano con una colorazione gialla.

Sia per la Candida che per le colonie cromaticamente gialle è stato quindi chiaro come il problema derivasse da una sovrapposizione dei colori del background con quelli tipici di queste infezioni. Prima di tutto, sfruttando il dataset Giallo e il dataset Candida,

si è provato a rappresentare nello spazio (a, b) i valori dei pixel delle due tipologie. Dato che, come nel caso del background, anche questi due dataset sono stati costruiti estraendo a mano le regioni di interesse, è stato necessario applicare un taglio dei pixel in base alla concentrazione, per evitare di rappresentare colori introdotti accidentalmente ma non effettivamente appartenenti alle colonie.

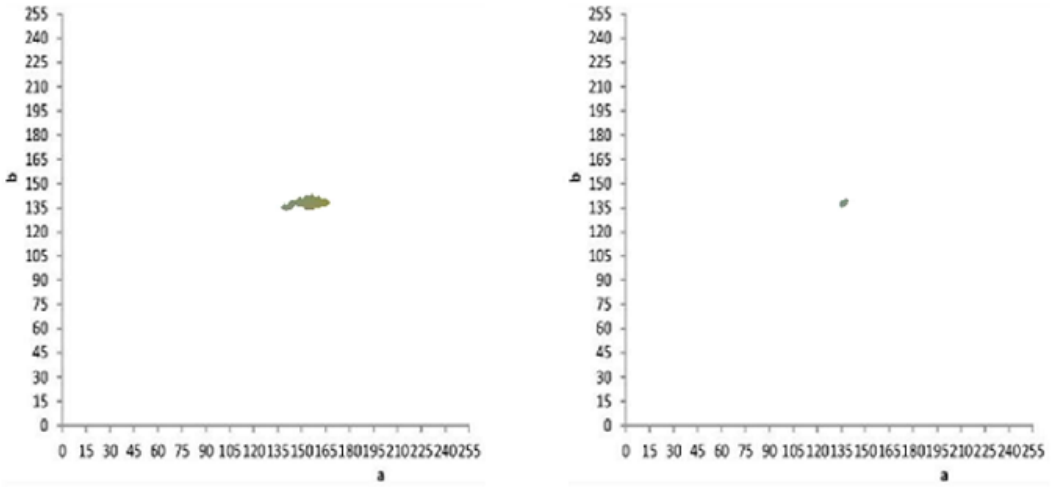


Figura 3.9: Distribuzione dei colori nello spazio (a,b) delle colonie gialle (a sinistra) e della Candida (a destra)

Sovrapponendo questi valori (*Figura 3.9*) con quelli ottenuti per il background (*Figura 3.7*), si può notare che per la Candida la sovrapposizione con il background è totale, mentre per il "Giallo" non è così.

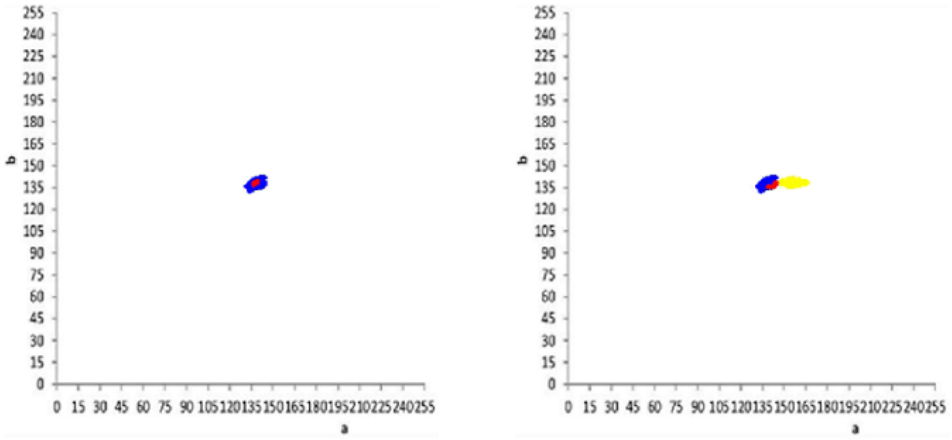


Figura 3.10: Sovrapposizione (rosso) fra Candida e background (blu)

Figura 3.11: Sovrapposizione (rosso) tra background (blu) e le colonie gialle (giallo)

Utilizzando queste regioni sovrapposte (regioni in rosso in *Figura 3.10* e *3.11*), insieme ad altre informazioni locali, è possibile separare il background da queste tipologie di colonie. Dato che la regione rappresentante la Candida non si sovrappone in maniera rilevante con quella tipica del "Giallo" (*Figura 3.12*) è stato inoltre possibile sviluppare due procedure separate per l'identificazione delle due tipologie di infezione.

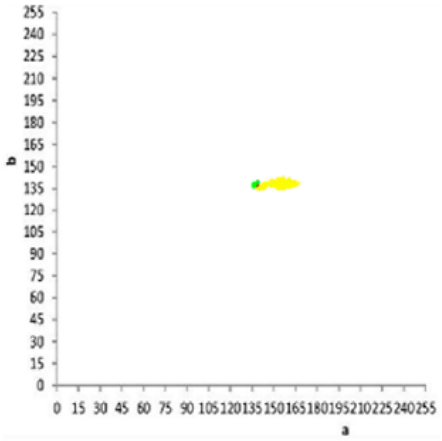
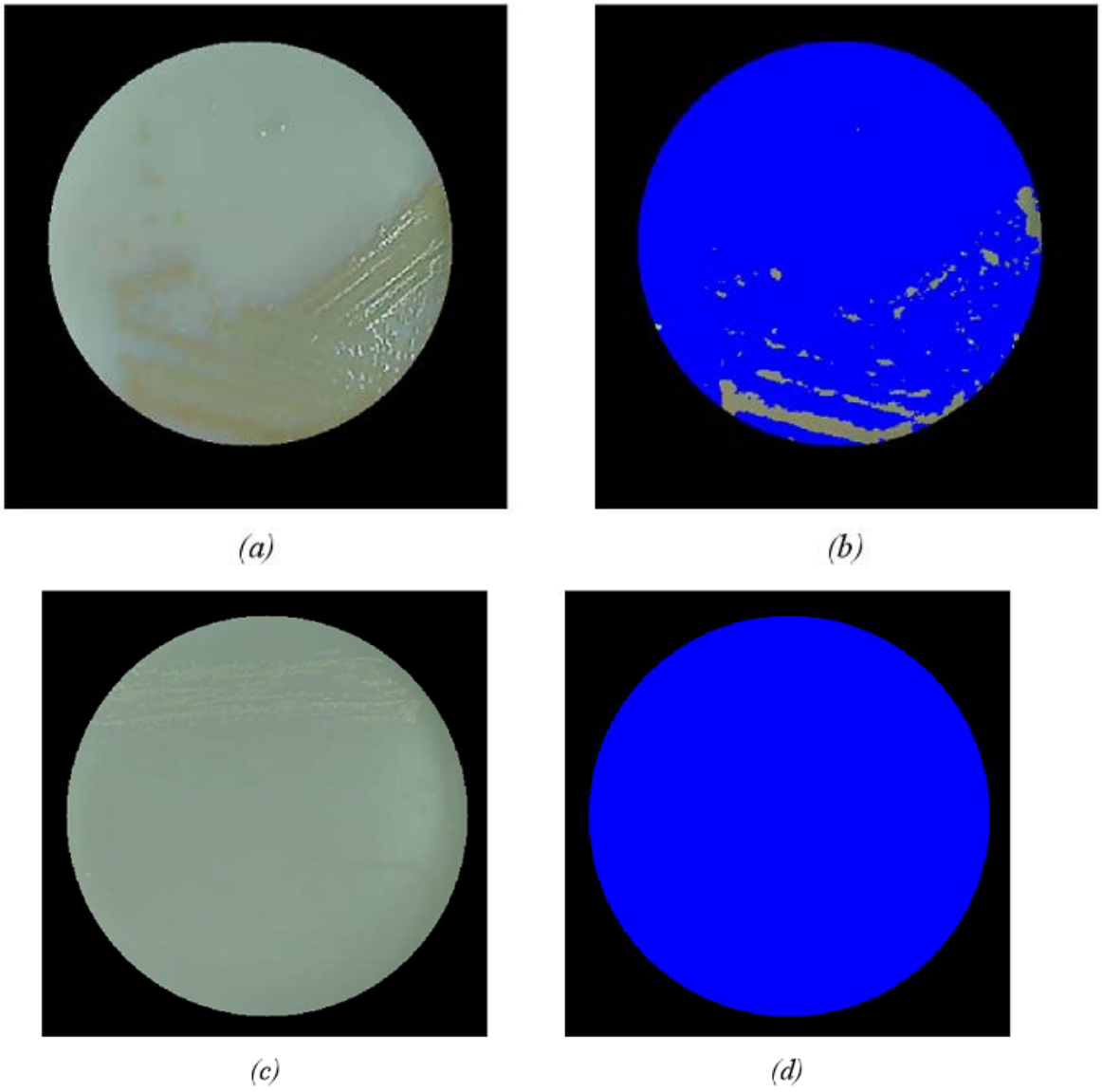


Figura 3.12: Sovrapposizione fra Candida (verde) e colonie gialle (giallo)

3.6.3 Identificazione del background

Per identificare il terreno di coltura, come prima fase, è stato applicato l'algoritmo di clustering Mean–Shift, in modo da raggruppare i pixel in segmenti in base alle loro componenti cromatiche e alla loro disposizione spaziale. Successivamente, dopo aver convertito l'immagine in Lab, si controlla se i segmenti estratti da Mean–Shift (il colore risultante corrisponde alla moda della distribuzione) appartengono alla regione identificata dalla maschera in *Figura 3.7*. In tal caso, i pixel vengono identificati come potenziali pixel di background. Come già detto, usando solo questo tipo di informazione, non si riesce a distinguere correttamente il terreno né dalle colonie "Gialle" né dalla Candida (*Figura 3.13*).



(a) *(b)*

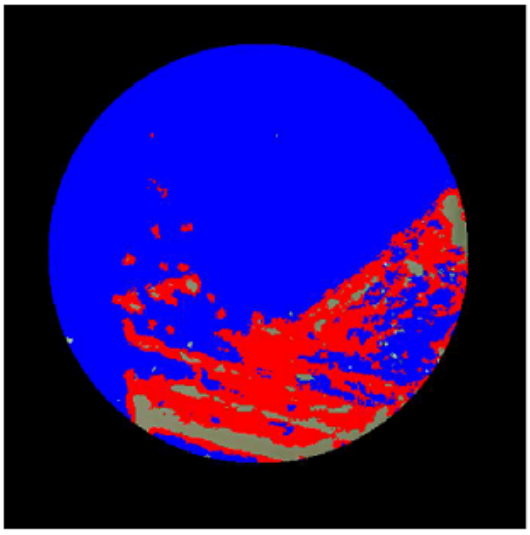
(c) *(d)*

Figura 3.13: Le immagini (a) e (c) rappresentano, rispettivamente, due piastre contenenti Pseudomonas e Candida, mentre in (b) e (d) sono state colorate in blu le parti rilevate come terreno di coltura

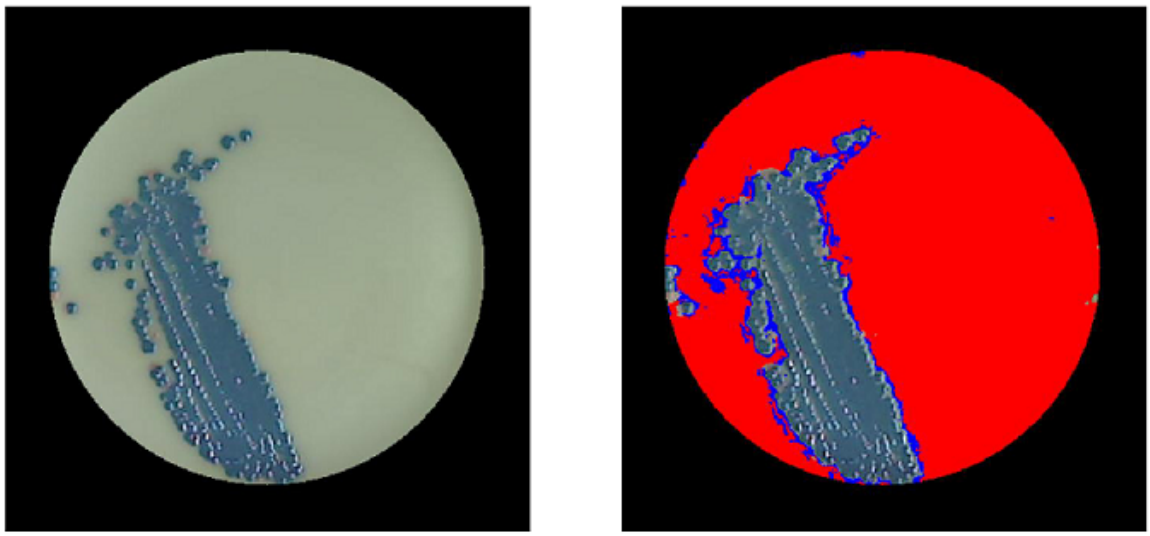
3.6.4 Rilevamento delle colonie gialle

Per rilevare la presenza di colonie con colorazione gialla, in una prima fase, sono stati raggruppati tutti i valori dei pixel calcolati con Mean–Shift, appartenenti alla regione di sovrapposizione (*Figura 3.11*), e sono stati etichettati come regione di incertezza. All'interno di questa zona, è stato necessario sfruttare informazione locale, e non più globale, in quanto lo stesso colore che in alcune piastre caratterizza lo sfondo in altre è tipico delle colonie "Gialle". Ciò accade sia a causa di condizioni di luce differenti, sia in base alle diverse tipologie di colonie sviluppatesi sulla piastra, che possono blandamente influire sulla colorazione dal terreno circostante.

(a)



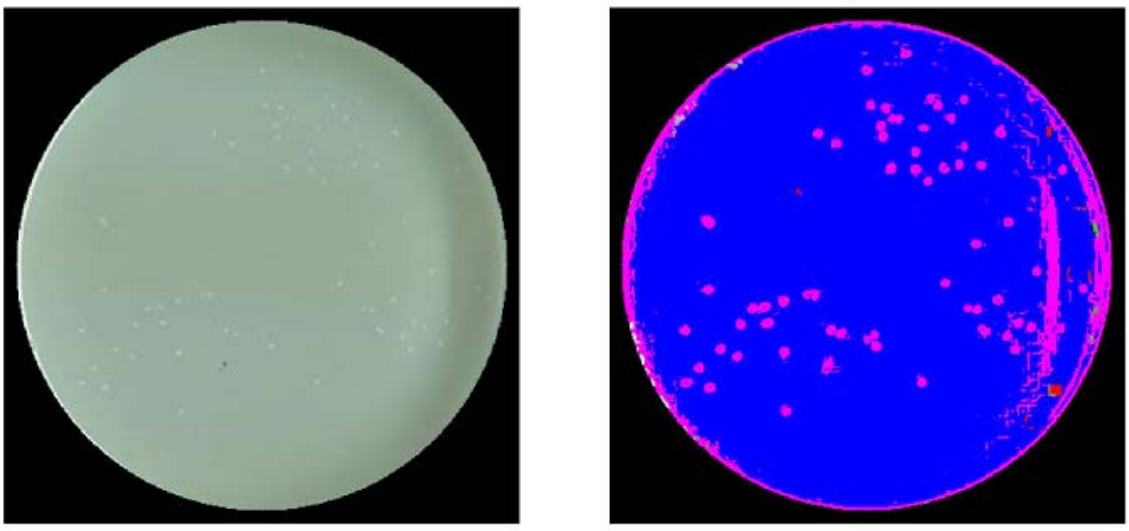
(b)



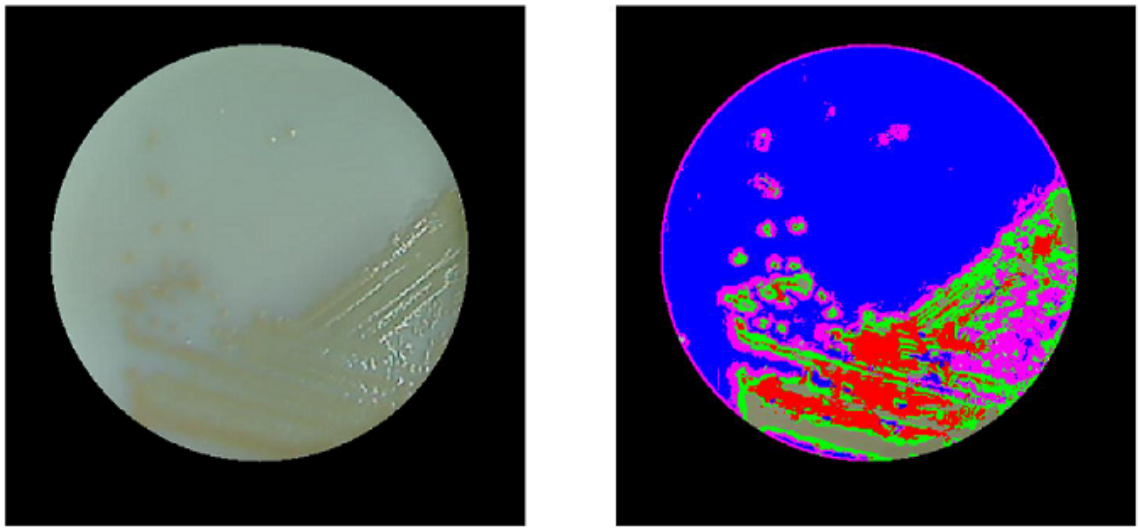
(c) (d)

Figura 3.14: Nell'immagine (a) e (c) sono rappresentate due piastre rispettivamente di Pseudomonas e di Kes, mentre in (b) e (d), in rosso, è stata evidenziata la regione d'incertezza

Inoltre è ragionevole pensare che le zone contenenti colonie siano più ricche di contorni rispetto al background; quindi, il passo successivo, sfruttando l'operatore di Sobel, è stato quello di andare a cercare gli edge sia all'interno della regione di incertezza che nella parte rilevata sicuramente come background. In questo modo si è ottenuto un ulteriore raffinamento del risultato.



(a) (b)



(c) (d)

Figura 3.15: Le immagini (a) e (c) contengono, rispettivamente, colonie di Candida e Pseudomonas. Nelle immagini (b) e (d), in verde, sono stati evidenziati gli edge rilevati nella regione di incertezza, in rosa gli edge del background, in blu il background e in rosso la regione di incertezza priva di edge

Ricapitolando, nelle piastre vengono identificate 5 regioni:

(1) Regione contenente sicuramente colonie (Coli, Kes, Faecalis o S. Agalactiae)
(2) Background senza edge
(3) Edge del background
(4) Regione d'incertezza senza edge
(5) Edge della regione d'incertezza

È necessario quindi stabilire se le regioni in (4) e (5) contengano colonie oppure terreno. Pur non potendo calcolare i valori globali tipici delle colonie gialle, è stato rilevato sperimentalmente che in una stessa piastra i valori del canale H in HSV sono molto differenti tra pixel appartenenti al background e pixel appartenenti alle colonie gialle. Sono state quindi analizzate separatamente le due regioni di incertezza utilizzando la seguente procedura applicata in sequenza prima alla regione (4) e poi alla (5).

La regione di dubbio, per come è stata estratta, potenzialmente può contenere due distribuzioni (background e colonie gialle); per separarle è stato utilizzato il metodo di Otsu sul canale H. Vengono quindi ottenuti due cluster, che indicheremo come regioni (6) e (7). Per determinare se quest'ultima divisione è plausibile, calcoliamo l'istogramma in H delle due regioni, indicando con Z_6 e Z_7 i valori di H in cui i due istogrammi assumono valore massimo. Affinché la soglia ottenuta con il metodo di Otsu (T_h) sia ammissibile deve verificarsi che:

$$\begin{cases} Z_6 < T_h < Z_7 & se\ Z_6 < Z_7 \\ Z_7 < T_h < Z_6 & se\ Z_7 < Z_6 \end{cases} \tag{3.1}$$

Inoltre, la valle compresa fra i due picchi deve essere sufficientemente profonda:

$$\frac{h(T_h)}{\min\{h(Z_6), h(Z_7)\}} < \vartheta \tag{3.2}$$

dove $h(x)$ è il valore dell'istogramma in x e ϑ è una soglia che consente di verificare che il valore dell'istogramma nei picchi sia significativamente maggiore del valore dell'istogramma nella valle.

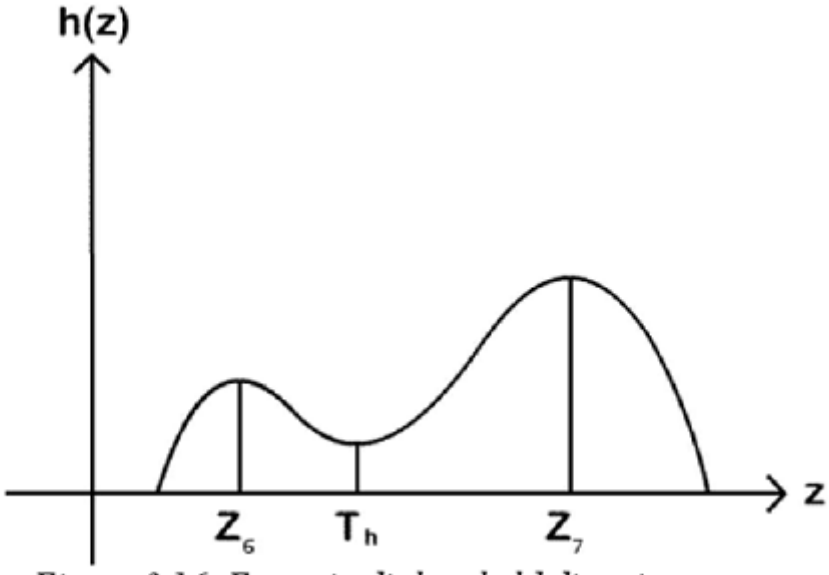


Figura 3.16: Esempio di threshold di un istogramma

Se le condizioni precedenti sono soddisfatte e se Z_6 e Z_7 sono sufficientemente distanti allora le regioni (6) e (7) vengono trattate separatamente; altrimenti, assumiamo che la regione non sia separabile. Il passo successivo consiste nel cercare di stabilire se la regione in analisi contiene colonie gialle oppure background. Consideriamo come riferimento il background senza edge (regione (2)), calcoliamo il picco dell'istogramma in questa regione e il picco nella regione da analizzare (6 e 7 insieme o separatamente, a seconda dei risultati ottenuti precedentemente). Se sull'asse H i picchi sono sufficientemente distanti, allora assumiamo che la regione possa contenere delle colonie gialle. Calcoliamo quindi, utilizzando di nuovo il metodo di Otsu, la soglia che separa il background (regione (2)) dalla regione in analisi. Confrontando i valori dei pixel con la soglia trovata si può decidere se essi appartengano o meno al terreno. Se invece i valori dei picchi sull'asse H risultano essere troppo vicini, si assume che la regione in analisi appartenga al terreno, in quanto la distanza in H tra la regione analizzata e ciò che è stato classificato sicuramente come sfondo non è da ritenersi significativa.

Come possiamo vedere in *Figura 3.17*, a sinistra, l'istogramma rosso appartiene a una regione contenete colonie gialle ed è evidente che i due picchi sono ben distinti, mentre, nell'immagine a destra, i due picchi sono praticamente sovrapposti ed è infatti questo il caso in cui la regione in analisi è anch'essa appartenente al background.

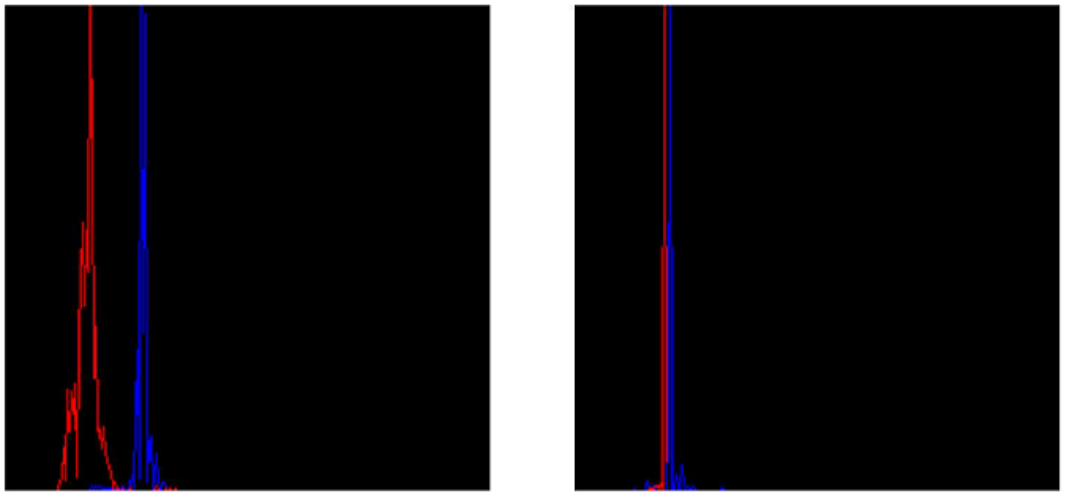


Figura 3.17: In blu l'istogramma del canale H del background e in rosso l'istogramma della regione in analisi

Brevemente, il procedimento descritto può essere riassunto nei seguenti passi:

1. Calcolo di una soglia con il metodo di Otsu sul canale H della regione analizzata;
    1.1. Calcolo degli istogrammi delle due regioni ottenute utilizzando la soglia calcolata al passo 1.;
    1.2. Verifica, tramite le equazioni (3.1) e (3.2), che la separazione così ottenuta sia significativa;
2. Se la separazione è ritenuta significativa e i picchi sono sufficientemente distanti sull'asse H, si esaminano separatamente le due regioni ottenute (6) e (7), altrimenti si assume che costituiscano un'unica regione;
3. Calcolo del picco dell'istogramma della regione background (2) e del picco della regione analizzata (regioni (6) e (7), separatamente o assieme);
4. Se i picchi sull'asse H sono sufficientemente distanti fra loro, si calcola una soglia di separazione con il metodo di Otsu e la si usa per decidere se i pixel della regione di incertezza appartengano al background o alle colonie gialle;
5. Se i picchi non sono sufficientemente distanti, la regione analizzata è caratterizzata da valori di H che non si discostano molto da quelli già etichettati come terreno e quindi possono essere identificati come tali.

3.6.5 Rilevamento di infezione da Candida

La Candida ha una colorazione tipica che si sovrappone completamente a quella del terreno di coltura (*Figura 3.10*); dato che, tuttavia, non vi è una significativa sovrapposizione con i colori delle colonie gialle (*Figura 3.12*), per isolarla dallo sfondo, è stato deciso di analizzare solo le regioni che nel precedente paragrafo sono state etichettate come regioni (2) e (3) (rispettivamente background senza edge e edge del background). La variazione della Candida rispetto al terreno è visivamente meno percettibile rispetto a quella rilevabile con le altre tipologie di infezione; spesso, infatti, si è in grado di rilevarne la presenza solo grazie agli highlight presenti nell'immagine. Gli stessi biologi, al momento dell'identificazione della Candida sono soliti aiutarsi inclinando la piastra in varie angolazioni per riconoscerne la presenza in base ai riflessi che si determinano e alla conformazione tridimensionale della colonia. È quindi evidente che le informazioni disponibili utilizzando immagini scattate in una posizione fissa sul supporto sono molto limitanti, perché non permettono di distinguere la componente di profondità dell'immagine.

La feature principale che è stata usata per riconoscere potenziali infezioni da Candida è rappresentata dagli edge. Essi infatti si trovano in zone localmente non uniformi all'interno del background, il che costituisce un indice della presenza di elementi non appartenenti al terreno di coltura. Le possibili infezioni da Candida vengono quindi ricercate solo nella regione (3), cioè quella in cui sono stati rilevati edge all'interno della regione di background. Come verrà illustrato in seguito, nel paragrafo relativo alla classificazione delle colonie, per la Candida è stato progettata una procedura di riconoscimento a sé stante, che prenderà in analisi solo la regione (3), mentre per l'identificazione delle altre tipologie di infezione questa regione non verrà

mai presa in considerazione.

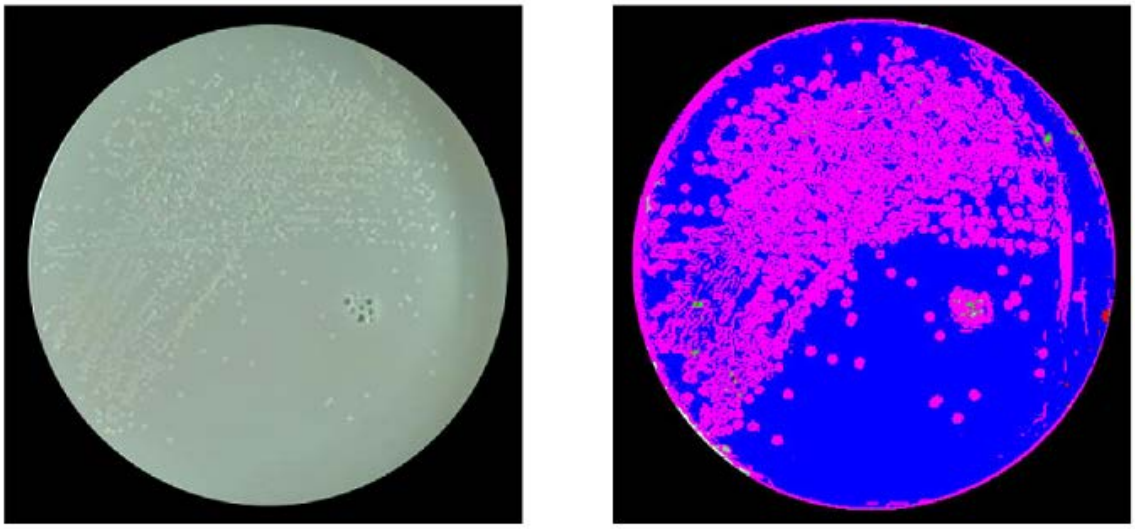


Figura 3.18: In rosa, gli edge rilevati all'interno del background

3.6.6 Risultati sperimentali

Per valutare la procedura di identificazione e rimozione del terreno di coltura, le prestazioni del sistema sviluppato sono state verificate sul test set, composto da 33 immagini mai utilizzate in fase di addestramento. I risultati ottenuti sono i seguenti:

- Totale pixel di background analizzati = 1091413
- Pixel riconosciuti come background = 1068445
- Pixel non riconosciuti come background = 22968
- Accuratezza 97,9%

Come si può vedere dai risultati, le prestazioni del sistema sono molto buone. Utilizzando questo modulo, abbiamo quindi sviluppato un metodo per l'estrazione automatica dei dataset di immagini da utilizzare nelle successive fasi di elaborazione (vedi paragrafo 3.7). Inoltre, l'estrazione del background è utile come fase di preprocessing per facilitare le successive fasi di classificazione e conta batterica.

3.7 Estrazione automatica dei dataset delle colonie

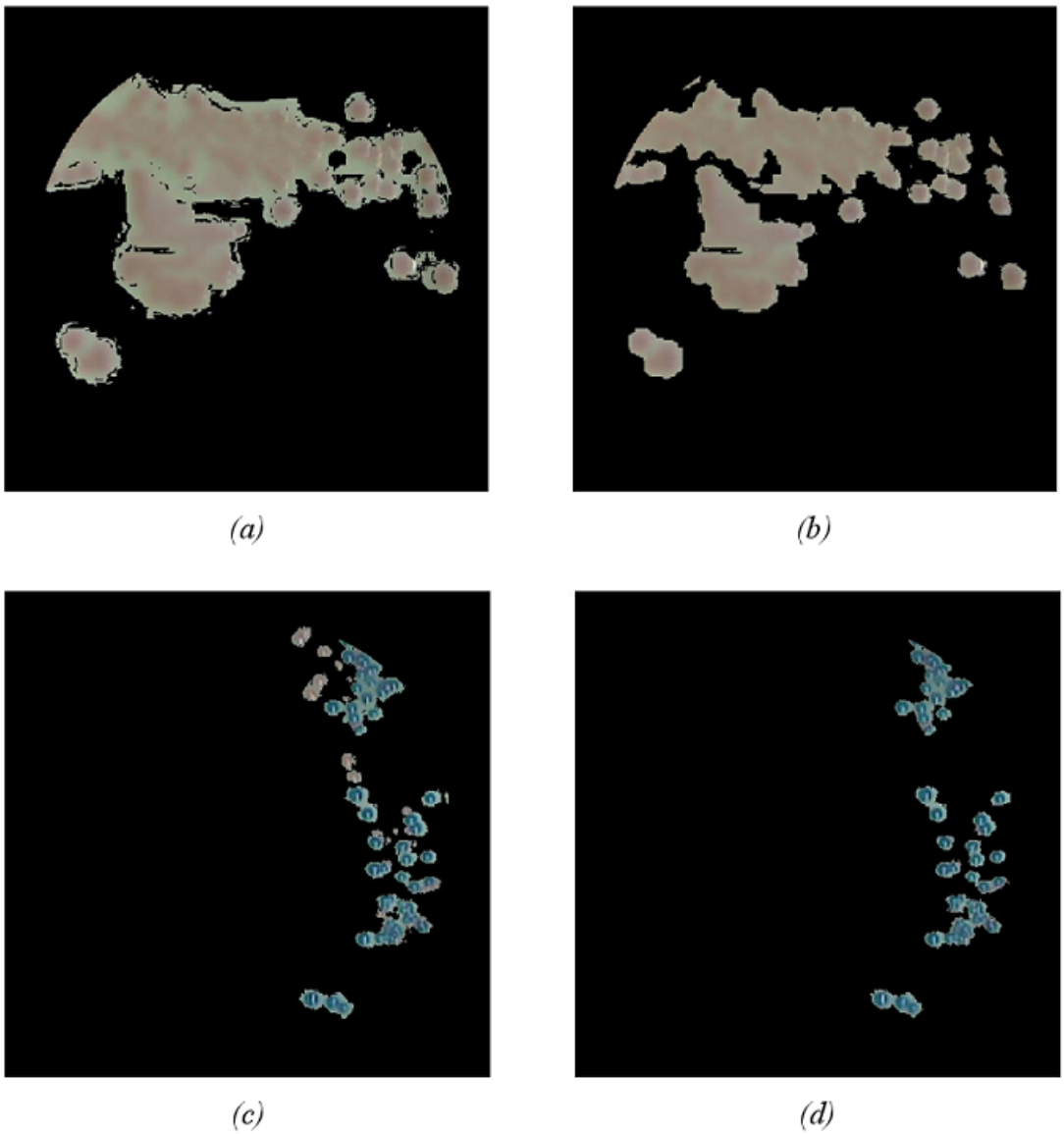
Prima di passare alla fase di identificazione delle infezioni, è necessario creare i dataset che verranno utilizzati per l'addestramento dei classificatori. I buoni risultati ottenuti con l'identificazione e la rimozione del terreno di coltura consentono di sfruttare il sistema sviluppato per andare a estrarre dalle immagini solo le regioni contenenti colonie. Essendo interessati a creare un dataset per ogni tipologia di infezione, la procedura sopra descritta è stata leggermente modificata e affinata. Potendo infatti, in questo caso, conoscere a priori la tipologia della colonia presente nella piastra è stato possibile sfruttare questa conoscenza per rendere l'estrazione del terreno ancor più precisa.

Per prima cosa, a partire dal dataset completo a disposizione, sono state inserite le immagini relative ad ognuna delle classi batteriche in directory separate. Per ogni classe, in particolare, è stato creato un training set, un validation set ed un test set. La conoscenza della tipologia batterica presente in una determinata immagine, ha permesso

di applicare la procedura di riconoscimento delle colonie gialle solo alle tre tipologie batteriche che si manifestano con quella colorazione, mentre negli altri casi il riconoscimento dello sfondo è stato eseguito semplicemente confrontando i valori prodotti da Mean–Shift con quelli della maschera di background (*Figura 3.7*). Questo procedimento ha reso la rimozione del background nelle colonie tipo Coli, Faecalis, Kes e S. Agalactiae più preciso in quanto, escludendo a priori la presenza di colonie gialle, tutti i pixel che in queste piastre sarebbero caduti nelle regioni di incertezza (cosa che accade spesso con i bordi delle colonie, ad esempio, di Coli) sono stati invece immediatamente etichettati come sfondo ed eliminati.

Un ulteriore miglioramento è stato ottenuto calcolando l'istogramma sul canale H in HSV sia della regione etichettata come background che della regione infetta. Succede infatti talvolta che regioni di sfondo vicine ad una colonia tendano ad avere un colore più simile a quello della colonia stessa rispetto al resto del background, il che può determinare un'errata associazione di questi punti. Tuttavia, confrontando i valori di H dei pixel con quelli dei picchi degli istogrammi calcolati, sono stati mantenuti all'interno della classe colonie solamente i pixel più vicini al picco relativo alla regione infetta della piastra. Ciò consente di migliorare ulteriormente le prestazioni del modulo di rimozione del background, eliminando parti di terreno dubbie nei pressi di una colonia. Allo stesso tempo tempo, nella maggior parte dei casi, permette di conservare solo le infezioni predominanti (nel caso in cui all'interno della piastra sia presente più di una tipologia batterica).

Le modifiche introdotte sono utilizzabili sono in fase di creazione dei dataset, mentre in fase di classificazione questi accorgimenti non possono essere sfruttati in quanto la classe di appartenenza delle colonie non è nota a priori.



(a) *(b)*

(c) *(d)*

Figura 3.19: Nelle immagini (a) e (c) il background è stato estratto con il metodo standard, mentre nelle immagini (b) e (d) il riconoscimento del terreno è stato raffinato per la creazione utilizzandola conoscenza a priori sulle colonie

Visto che la procedura descritta permette di isolare efficacemente le colonie batteriche dal terreno di coltura, può essere usata anche (in maniera inversa) per creare dataset per i terreni di coltura, più precisi di quelli estratti manualmente.

Per quanto riguarda invece la creazione del dataset contenente le colonie di Candida la procedura non è efficiente; infatti, come già visto nei precedenti paragrafi, sfruttando questo metodo, la Candida rimane indistinta all'interno della regione contenente gli edge del terreno. Per estrarre automaticamente da queste regioni solo i pixel tipici della Candida si può applicare la maschera in *Figura 3.9*. Con le informazioni a disposizione al momento, quello appena suggerito rimane l'unico modo utilizzabile per risolvere questo problema. Appare ovvio però che, non essendo stato applicato alcun metodo per perfezionare la ricerca della Candida, il dataset così prodotto non potrà che risultare equivalente a quello creato manualmente, cosa che influirà molto sulle prestazioni del classificatore per questo tipo di infezione.

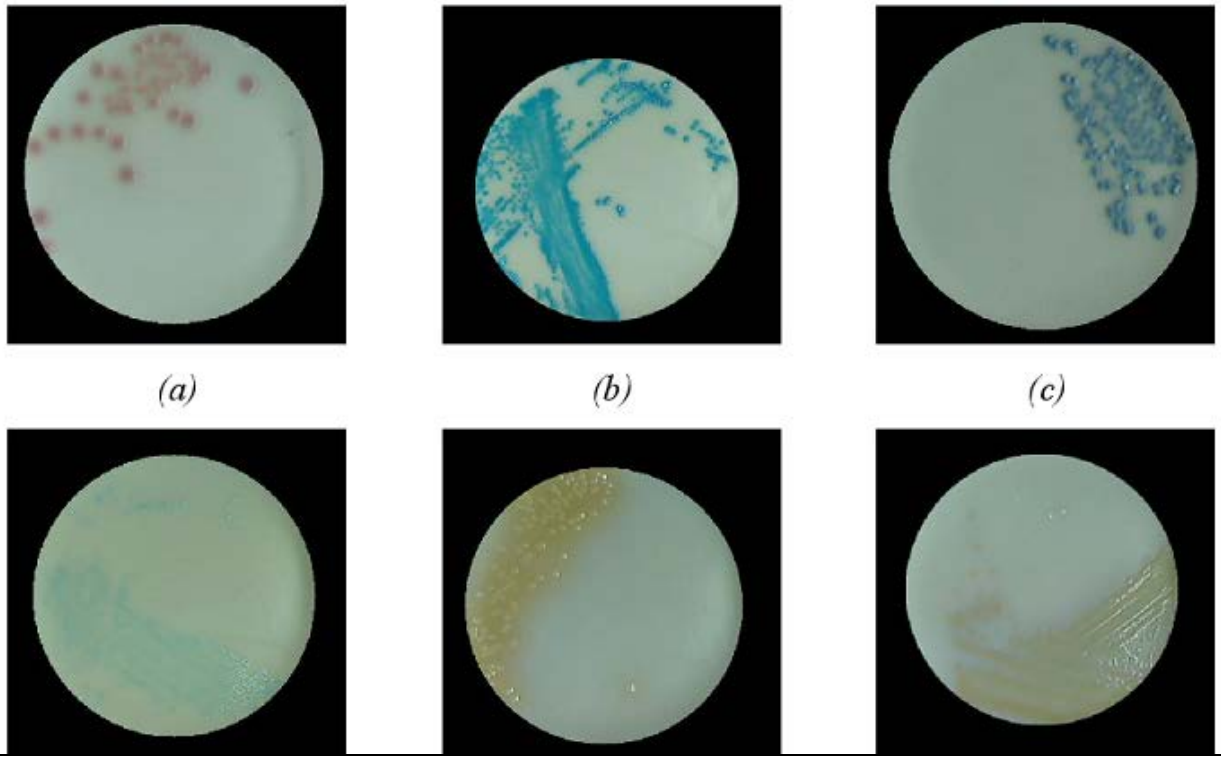
Per concludere, la procedura così sviluppata consente di estrarre in modo automatico i dataset contenenti esclusivamente i pixel relativi alle colonie batteriche. Le immagini così ottenute verranno poi sfruttate per estrarre le feature necessarie alla fase di addestramento dei classificatori.

3.8 Classificazione e conta delle colonie batteriche

In questo paragrafo verrà introdotto brevemente il lavoro svolto in relazione alla classificazione ed alla conta delle colonie batteriche, oggetto precipuo della tesi di Paolo Andreini, mostrando alcuni risultati preliminari.

Le immagini utilizzate riguardano piastre di Petri con terreno cromogeno (Uriselect 4), relativamente alle quali, le principali infezioni, distinguibili sfruttando la colorazione delle colonie, sono le seguenti:

- Escherichia Coli (*Figura 3.20 (a)*)
- Enterococcus Faecalis (*Figura 3.20 (b)*)
- Gruppo KES (*Figura 3.20 (c)*)
- Streptococcus Agalactiae (*Figura 3.20 (d)*)
- Proteus (*Figura 3.20 (e)*)
- Pseudomonas (*Figura 3.20 (f)*)
- Staphylococcus Aureus (*Figura 3.20 (g)*)
- Candida (*Figura 3.20 (h)*)



(a) *(b)* *(c)*

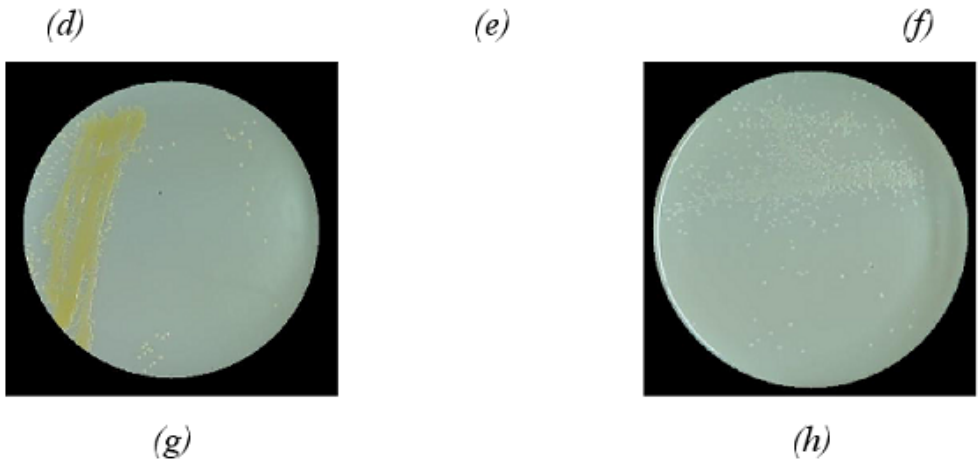


Figura 3.20: Piastre di Petri delle tipologie di infezioni classificate

Identificare le diverse tipologie di colonie batteriche non è stato un compito banale, sia perché, come si può vedere in *Figura 3.20,* vi sono più tipologie di infezioni che si manifestano con colorazioni simili, sia per la frequente contemporanea presenza di più infezioni, che può provocare modiche nella tonalità dei colori delle singole colonie, creando quindi ulteriori difficoltà in fase di classificazione.

È stato pertanto messo a punto un procedimento a più fasi. Per prima cosa si suddividono le classi di infezione in gruppi con colorazione simile, per facilitarne la distinguibilità e permettere una preclassificazione delle colonie. Sfruttando questa prima classificazione, sono poi stati usati classificatori specializzati che, basandosi sia su feature cromatiche che su altre tipologie di informazione (descritte nel seguito), portano a termine il processo di classificazione con risultati molto promettenti.

Il software messo a punto, quindi, dopo aver rimosso il terreno di coltura e dopo aver usato Mean–Shift segmentation per separare le zone della piastra con colorazione simile, sfrutta i seguenti 3 classificatori, per ottenere una prima suddivisione delle colonie in base al colore:

- Classificatore di Escherichia Coli
- Classificatore di colonie con colorazione blu (Gruppo KES, Enterococcus Faecalis, Streptococcus Agalactiae)
- Classificatore di colonie con colorazione gialla (Pseudomonas, Proteus, Staphylococcus Aureus)

Per tutti e tre i classificatori è stata usata una Support Vector Machine "one class Vs All" con kernel RBF (Radial Basis Function):

Classificatore di colonie blu

```
Numero totale dei segmenti analizzati:            21185
Segmenti classificati correttamente:              21100                99.5988 %
Segmenti classificati in modo errato:                85                 0.4012 %


=== Detailed Accuracy By Class ===

                 TP Rate  FP Rate  Precision  Recall   F-Measure  MCC      ROC Area  PRC Area  Class
                 0,996    0,004    0,997      0,996    0,996      0,992    0,996     0,995     0
                 0,996    0,004    0,995      0,996    0,996      0,992    0,996     0,993     1
Weighted Avg.    0,996    0,004    0,996      0,996    0,996      0,992    0,996     0,994

=== Confusion Matrix ===

     a     b   <-- classified as
 10971    47 |     a = 0
    38 10129 |     b = 1 (Blu)
```

Classificatore di colonie gialle

```
Numero totale dei segmenti analizzati:              20541
Segmenti classificati correttamente:                20476          99.6836 %
Segmenti classificati in modo errato:                  65           0.3164 %


=== Detailed Accuracy By Class ===

                 TP Rate   FP Rate   Precision   Recall   F-Measure   MCC      ROC Area  PRC Area  Class
                 0,999     0,037     0,997       0,999    0,998       0,976    0,981     0,997     0
                 0,963     0,001     0,992       0,963    0,978       0,976    0,981     0,958     1
Weighted Avg.    0,997     0,034     0,997       0,997    0,997       0,976    0,981     0,994

=== Confusion Matrix ===

     a     b   <-- classified as
 19061    11 |     a = 0
    54  1415 |     b = 1 (Giallo)
```

Come si può vedere, le tre classi vengono rilevate con ottima accuratezza; ciò consente quindi di identificare con precisione la presenza di colonie di tipo Coli mentre, per quanto riguarda le altre tipologie batteriche (gialle e blu), garantisce solo di eseguire un pre–etichettamento.

Per andare ad identificare le relative infezioni presenti nelle zone rilevate come contenenti colonie di tipo "blu" e colonie di tipo "giallo" sono stati addestrati classificatori specializzati, che agiscono separatamente nelle due regioni. Prendendo in considerazione solo feature cromatiche, gli specifici classificatori riescono ad ottenere buoni risultati; ci sono, tuttavia, situazioni particolari in cui non è stato sufficiente basarsi solo su informazioni derivanti dal colore, in quanto, in alcuni casi, la presenza contemporanea (con sovrapposizione) di più infezioni modifica le tonalità della colonia. Ad esempio, la contemporanea presenza di Faecalis e di Coli modifica il colore delle colonie del primo tipo, rendendole cromaticamente molto simili al KES (*Figura 3.21*).

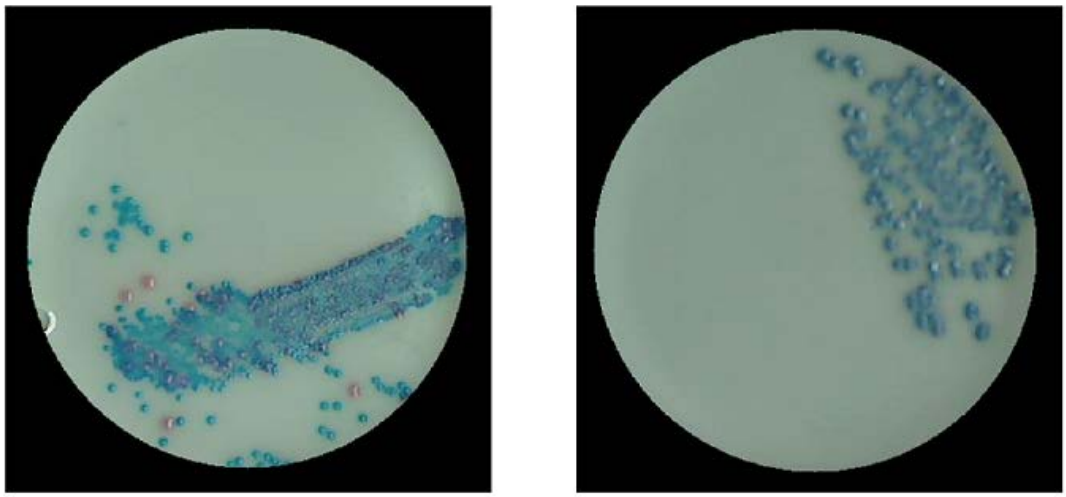
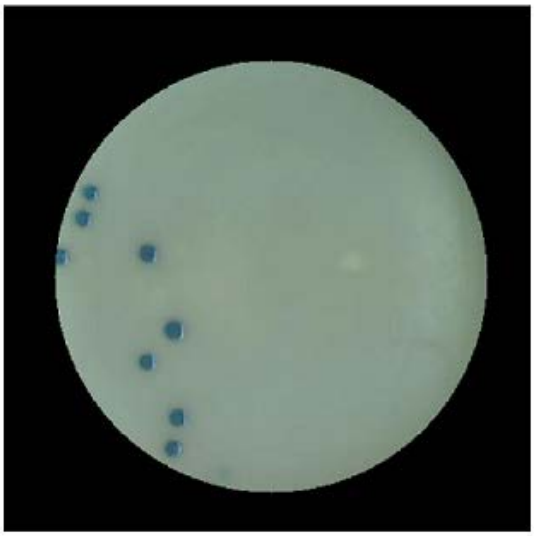
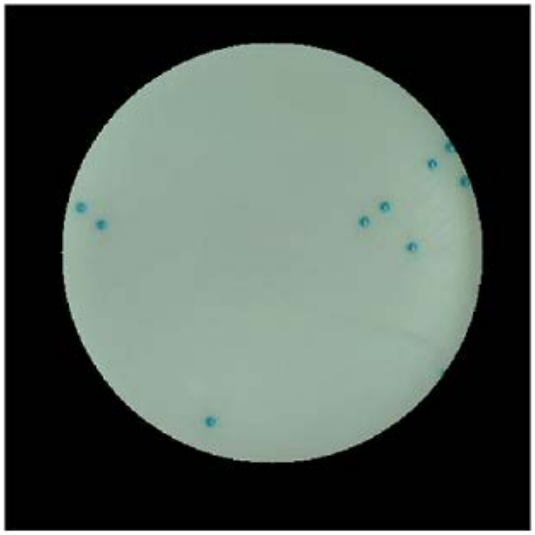


Figura 3.21: Nella piastra a sinistra, le colonie di Faecalis sono sovrapposte a colonie di Coli; nella piastra a destra, sono presenti solo colonie di KES

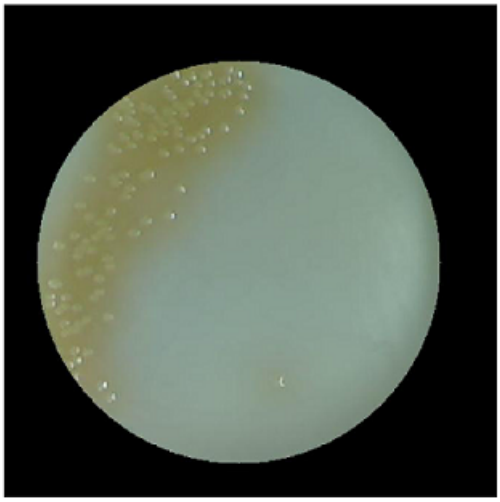
Per provare ad identificare le infezioni nei casi "non standard" – in cui le colonie non si esprimono con il loro colore classico –, è stato necessario sviluppare un'ulteriore procedura che sfrutta maggiori informazioni, come la presenza contemporanea di più infezioni, le dimensione delle colonie (ad esempio, il KES genera una colonia con dimensione più grande rispetto al Faecalis, come è visibile in *Figura 3.22 (a)* e *(b)*), la presenza di un alone marrone attorno alle colonie di Proteus (*Figura 3.22 (c)*), etc.



(a)



(b)



(c)

Figura 3.22: La piastra (a) contiene colonie di KES, la (b) di Faecalis, mentre, nell'immagine (c), sono visibili le colonie di Proteus con il relativo alone

Di seguito alcuni

risultati ottenuti utilizzando due Support Vector Machine "multiclasse" con kernel RBF (3.3) dove $\gamma = 0{,}5$ e il valore di costo $C = 50$. Il primo classificatore andrà a lavorare nella regione che è stata pre–etichettata come contenente colonie blu e dovrà riconoscere le tre tipologie di infezione che si manifestano con questa colorazione (Kes, Faecalis e S. Agalactiae), mentre il secondo è stato addestrato per riconoscere le colonie con colorazione gialla (Proteus, Pseudomonas e S. Aureus).

Classificatore Kes, Faecalis e S. Agalactiae (con test set contenente solo piaster in cui è presente una sola tipologia di infezione)

Numero totale dei segmenti analizzati:		9405
Segmenti classificati correttamente:	8702	92.5253 %
Segmenti classificati in modo errato:	703	7.4747 %

=== Detailed Accuracy By Class ===

	TP Rate	FP Rate	Precision	Recall	F-Measure	MCC	ROC Area	PRC Area	Class
	0,963	0,014	0,983	0,963	0,973	0,951	0,976	0,965	0
	0,930	0,072	0,913	0,930	0,922	0,857	0,930	0,882	1
	0,756	0,031	0,750	0,756	0,753	0,722	0,863	0,595	2
Weighted Avg.	0,925	0,042	0,926	0,925	0,926	0,884	0,943	0,887	

=== Confusion Matrix ===

a	b	c	<-- classified as
3997	146	9	a = 0 (KES)
45	3926	251	b = 1 (Faecalis)
26	226	779	c = 2 (S. Agalactiae)

Classificatore Kes, Faecalis e S. Agalactiae (con test set contenente piastre in cui è presente più di una tipologia di infezione)

```
Numero totale dei segmenti analizzati:                7085
Segmenti classificati correttamente:        5086      71.7855 %
Segmenti classificati in modo errato:       1999      28.2145 %


=== Detailed Accuracy By Class ===

                 TP Rate  FP Rate  Precision  Recall   F-Measure  MCC      ROC Area  PRC Area  Class
                 0,945    0,094    0,866      0,945    0,904      0,840    0,927     0,844     0
                 0,888    0,277    0,593      0,888    0,711      0,568    0,806     0,562     1
                 0,237    0,049    0,669      0,237    0,349      0,280    0,595     0,385     2
Weighted Avg.    0,718    0,138    0,723      0,718    0,680      0,589    0,791     0,620


=== Confusion Matrix ===

    a    b    c   <-- classified as
 2624  144    9 |    a = 0 (KES)
   12 1967  236 |    b = 1 (Faecalis)
  393 1205  495 |    c = 2 (S. Agalactiae)
```

Classificatore Proteus, Pseudomonas e S. Aureus

```
Numero totale dei segmenti analizzati:                3215
Segmenti classificati correttamente:        2401      74.6812 %
Segmenti classificati in modo errato:       814       25.3188 %


=== Detailed Accuracy By Class ===

                 TP Rate  FP Rate  Precision  Recall   F-Measure  MCC      ROC Area  PRC Area  Class
                 0,934    0,370    0,727      0,934    0,817      0,595    0,866     0,819     0
                 0,679    0,064    0,779      0,679    0,725      0,644    0,833     0,642     1
                 0,413    0,033    0,797      0,413    0,544      0,493    0,819     0,601     2
Weighted Avg.    0,747    0,213    0,756      0,747    0,730      0,583    0,847     0,723


=== Confusion Matrix ===

    a    b    c   <-- classified as
 1540   59   50 |    a = 0 (Proteus)
  229  547   30 |    b = 1 (S. Aureus)
  350   96  314 |    c = 2 (Pseudomonas)
```

Dai risultati si deduce che, per il riconoscimento delle infezioni Kes, Faecalis e S. Agalactiae, nei casi in cui non vi siano sovrapposizioni di colonie diverse, le prestazioni ottenute sono molto buone, sono invece peggiori nelle situazioni in cui la presenza contemporanea di più colonie ne modifica la tonalità di colore. Per quanto riguarda l'identificazione delle colonie di Proteus, Pseudomonas e S. Aureus i risultati sono invece peggiori, ma soggetti a significativi miglioramenti, avendo a disposizione un dataset di immagini più vasto (il numero di immagini al momento disponibili di queste tre tipologie è molto scarso).

È stato infine addestrato un modello per l'identificazione della Candida, che riconosce tale tipologia di infezione andando ad analizzare i pixel appartenenti alla regione preventivamente riconosciuta come background contenente edge.

Al termine della procedura di classificazione viene infine eseguita la conta batterica. Dove è possibile vengono contate le singole colonie (blob) per ogni tipologia di infezione rilevata sulla piastra di Petri; nei casi in cui le colonie non siano distinguibili viene invece calcolata una stima in base alle dimensioni della zona infetta.

Il programma sviluppato, una volta eseguita la classificazione e la conta, mostra i risultati attraverso l'interfaccia grafica e consente all'operatore di correggerli manualmente in caso di errore del software. Terminata questa fase di controllo i risultati vengono salvati insieme all'immagine della piastra, rendendoli disponibili per future consultazioni.

Bibliografia

[1] M. Polsinelli, M. De Felice, A. Galizzi, E. Galli, G. Mastromei, P. Mazza, G. Viale, *Microbiologia*, Bollati Boringhieri, 1993.

[2] A. Camporese, *L'esame microbiologico dell'urina*, Riv Med Lab – JLM, Vol. 3, N. 1, 2002.

[3] Bio–Rad Laboratories – UriSelect TM 4, *Clinical Microbiology – Bacteriology*
http://did.it/contenuti/biorad/UriSelect.pdf

[4] Bio–Rad Laboratories – UriSelect TM 4, *Isolation and counting of urinary pathogens*
http://www.techmicrobio.eu/documentation_fabricants/Biorad%20diagnostics%20pasteur/pdf/55800.pdf

[5] B. T. Cenci Goga, *La coltivazione dei batteri*,
http://unipg.it/cencigog/batteri.pdf

[6] D. A. Forsyth, J. Ponce, *Computer Vision: A Modern Approach*, Prentice Hall, 2nd Ed., 2011.

[7] R. Szeliski, *Computer Vision: Algorithms and Applications*, Springer, 2011.

[8] M. Shah, *Fundamentals of Computer Vision*, http://www.cs.ucf.edu/courses/cap6411/book.pdf

[9] J. C. Russ, *The Image Processing Handbook*, CRC Press, Sixth Edition, 2011.

[10] T. Acharya, A. K. Ray, *Image Processing: Principles and Applications*, Wiley, 2005.

[11] F. Y. Shih, *Image Processing and Mathematical Morphology: Fundamentals and Applications*, CRC Press, 2009.

[12] R. O. Duda, P. E. Hart, *Use of the Hough transformation to detect lines and curves in pictures*, 1971

[13] D. Comaniciu, P. Meer, *Mean Shift: A Robust Approach toward Feature Space Analysis*, 2002

[14] A. Mecocci, *Dispense del corso di elaborazione delle immagini*, Università degli Studi di Siena, A.A. 2012/13.

[15] C. Distante, *Dispense del corso di elaborazione delle immagini* http://www.ino.it/home/cosimo/ttr/

[16] F. Viola, *Appunti elaborazione delle immagini* http://www.salug.it/~fabioviola/unibo/elab_immagini/

ATTIVITA' 3: Studio terreni agarizzati, ottimizzazione

ATTIVITA' 4: Verifica contro semina manuale come riferimento

ATTIVITA' 5: Sperimentazione interna ed esterna (sia su ceppi di collezione che "selvaggi")

L'attività è state accorpate svolte e concluse e si è articolata nelle seguenti fasi

Premessa :

La ricerca di un terreno diverso per il device robobact è stata effettuata al fine di trovare un prodotto che fosse generico per i patogeni urinari, che lavorasse bene nel range di T 33-40°C e che ci aiutasse ad aumentare sensibilità e specificità soprattutto della specie Escherichia coli (90% dei casi). La prima serie di prove é stata fatta aggiungendo dei reattivi a terreni liquidi. La seconda serie a seguire sarebbe stata quella dell'aggiunta di varie concentrazioni di agar.

[a] PROVE TERRENO CON AGGIUNTA DI H2O CHROM.

L'aquaCHROM è un sistema analitico la cui peculiarità è l'identificazione colorimetrica in blu di Escherichia coli in acqua. È probabile che tale prodotto presenti l' **X-gal** (abbreviato anche in **BCIG** per bromo-cloro-indolil-galattopiranoside) è un composto organico consistente in una molecola di galattosio legata ad un indolo sostituito. È ampiamente utilizzato in biologia molecolare. L'X-gal, viene scisso dalla β-galattosidasi producendo galattosio e 5-bromo-4-cloro-3-idrossindolo. Quest'ultimo è quindi ossidato in 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indaco, un composto blu insolubile. Quindi, se dell'X-gal ed un induttore della β-galattosidasi (molto utilizzato è l'IPTG) sono aggiunti ad un terreno a base di agarosio in una piastra di coltura, le colonie batteriche con un gene "lacZ" funzionale possono essere distinte dalle altre. Colonie di Escherichia coli sono quasi sempre β-galattosidasi positive e quindi rispondono in maniera positiva alla presenza di questo substrato.

La prova è stata strutturata facendo una diluizione seriale a cui è stato introdotto tale composto 10 volte più concentrate rispetto all'indicazione del fornitore. Le provette così pronte sono state poste in un incubatore a 37°C con una telecamera che le riprendesse in maniera tale da cogliere il tempo reale di cambio colore.

La prova non ha dato il colore pubblicizzato dal fornitore. Solo la prima provetta quindi ~10^{10} ha dato una leggera colorazione verde (giallo del terreno + il blu dell'indolo), come descritto in Fig.1. Abbiamo inoltre effettuato un video di 24h in quanto ci aspettavamo una risposta su tutte le provette.

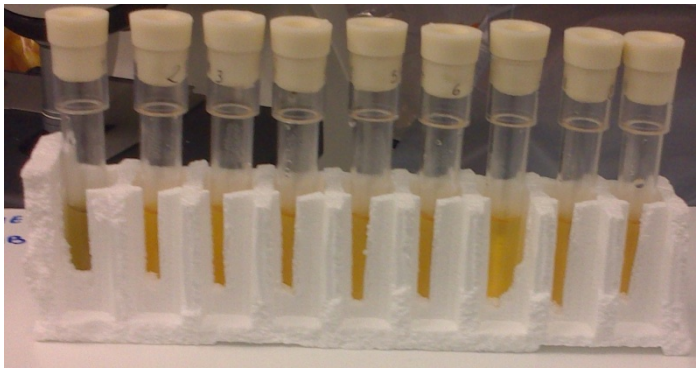


Fig. 1

A seguito è stata fatta una prova partendo da una soluzione di acqua microfiltrata, e aggiunto vari ceppi di Escherichia coli e altre enterobatteriacee. C'è stata una intensa risposta colorimetrica per i vari ceppi di Escherichia coli mentre altre specie (es Streptococcus fecalis) sono state inibite.

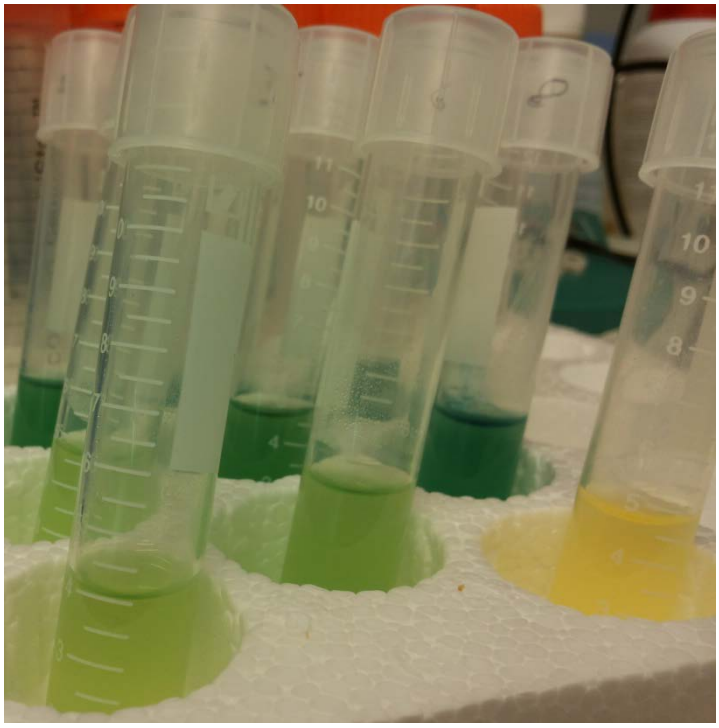


Fig.2 In verde ceppi di E.coli e in giallo il Kes

Tale studio al momento è stato abbandonato a causa della selettività del terreno solo ad alcune specie urinarie.

[b] PROVE TERRNO CON AGGIUNTA DI X-GAL E X-GAL/LATTOSIO

Lo studio bibliografico portato avanti, ci ha fatto escludere l'uso del reattivo di Kovac poiché corrosivo ed esplosivo, condizione non compatibile con le nostre necessità. Abbiamo utilizzato il reattivo solido utilizzato nei cromogeni ma ha mostrato in 2 diversi esperimenti la non colorazione di una concentrazione batterica superiore a 10^8. L'unico

reattivo che degna attenzione e ulteriori prove è sicuramente il reattivo X-Gal. Degli agenti patogeni ubiquitari delle vie urinarie l'unico Batterio che mostra una notevole sensibilità ad un'azione catabolica di questo composto è l'Escherichia coli la cui azione aumenta in presenza di lattosio. Tale colorante indolico è stato aggiunto ad una formulazione liquida in concentrazione variabile, con e senza lattosio. È stata a questo punto scelta la concentrazione che ha mostrato una risposta degna di studio. Sono stati presi diversi ceppi di collezione e preparati in diluizione logaritmica ($10^8 \rightarrow 10^4$). Per valutare anche il tempo di colorazione è stato effettuato un video di 24h per valutare il tempo necessario per la risposta colorimetrica. (~16h)

A seguire è stata fatta una prova su 50 campioni ospedalieri per valutarne anche la specificità

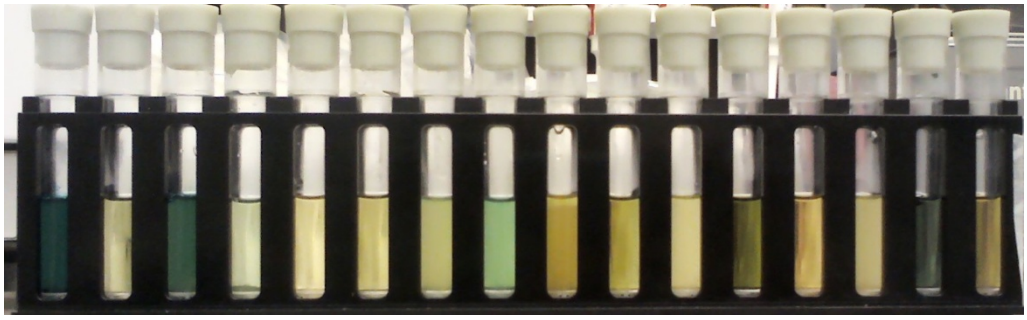


Fig.3 Serie di campioni urinari con differenti specie batteriche.

La colorazione blu,verde,marrone scuro, non è sempre dovuta alla presenza di Escherichia coli come ci aspettavamo, evidentemente bisogna aggiungere agenti selettivi a discapito di specie non appartenenti al gruppo delle Enterobatteriacee. Lo studio continuerà con l'aggiunta di agar e la valutazione della crescita batterica sulla superficie dello stesso.

[c] PROVE TERRNO LIQUIDO E SOLIDO CON AGGIUNTA MUG (4metil-umbelliferil-β-D-glucuronide)

È un substrato fluorogenico utilizzato largamente nella preparazione di terreni utilizzati soprattutto per lil controllo delle acque potabili e nel settore alimentare. Il MUG viene idrollizzato dall'enzima glucuronidasi.con il rilascio del composto fluorescente 4-metilumbelliferone visibile con la lampada di Wood. L'Escherichia coli e il maggior produttore di questo enzima. Il tempo di comparsa della fluorescente è variabile da 1h a 16h ed è strettamente legato alla concentrazione batterica. In media i campioni sono riconoscibili in 4h. Il dato fondamentale che deriva nell'usare questo composto è che la

sua reattività è più rapida del gas derivante dalla fermentazione del lattosio.

Le nostre prove sono state fatte aggiungendo il reattivo sia al terreno liquido (LB, Eugon Broth) e sia ai terreni solidi (Mac Conkey agar).

Il risultato è stato sorprendente, su 10 isolati clinici di Escherichia coli, tutti e 10 hanno risposto in maniera inequivocabile al test emettendo nell'ultravioletto

Fig. 4 e 5 Ceppi di E.coli con/senza luce ultravioletta

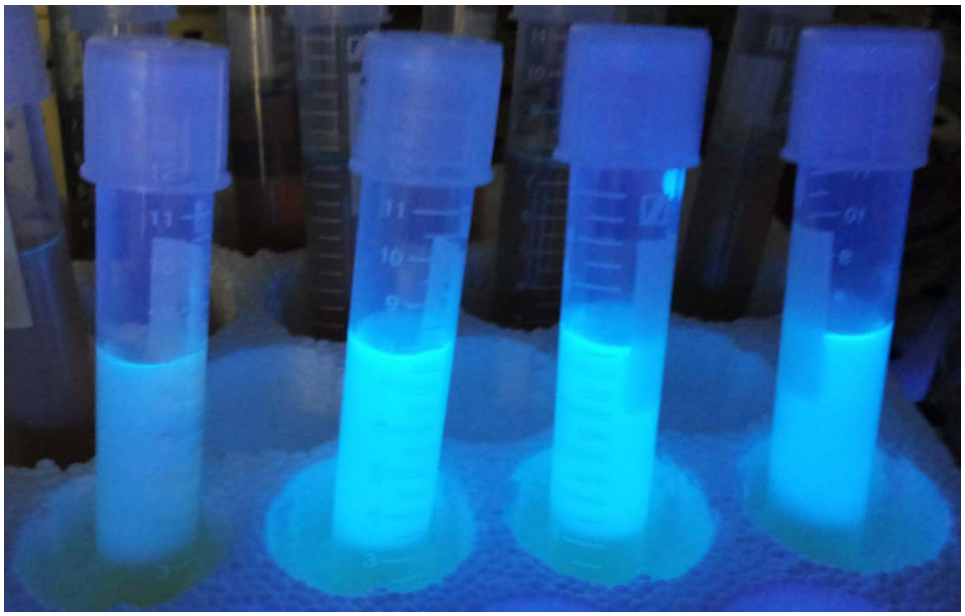


Fig. 6 Diverse intensità di risposta alla lampada di wood con differenti ceppi di E.coli.

Lo studio potrà proseguire solo dopo uno studio nell'automazione del riconoscimento della fluorescenza da parte di un dispositivo ottico in presenza di luce ultravioletta.

[d] PROVE PER VARIAZIONE DEVICE ROBOBACT

Nel 2012 e 2013 sono state effettuate delle prove esplorative per valutare la possibilità di utilizzare lo strumento seminatore Robobact non solo per isolare le specie presenti nei campioni biologici, ma anche per effettuare un'identificazione presuntiva delle specie e la successiva conta.

Fig. 7 Questa immagine rappresenta il risultato di un esperimento.

In ogni provetta/pozzetto erano stati posti 0,5ml di terreno cromogeno. Volevamo valutare se l'aggiunta di un campione con risposta cromogena nota fosse presente nell'interfaccia tra il terreno solido e il terreno liquido.

Risultato: Il terreno solido si è staccato dal fondo e inoltre non ha reagito secondo le proprie specifiche.

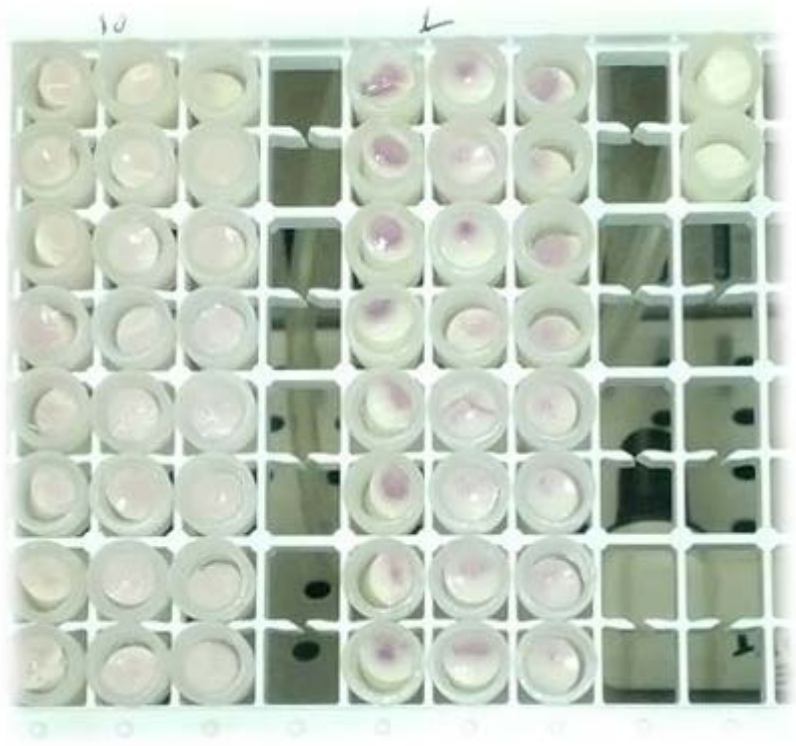


Fig. 8

È stato aliquotato del terreno solido in pozzett per micro saggi. Dopo l solidificazione è stata seminata una curva batterica. Scopo dell'esperimento: valutare visivamente la non crescita determinando così la carica.

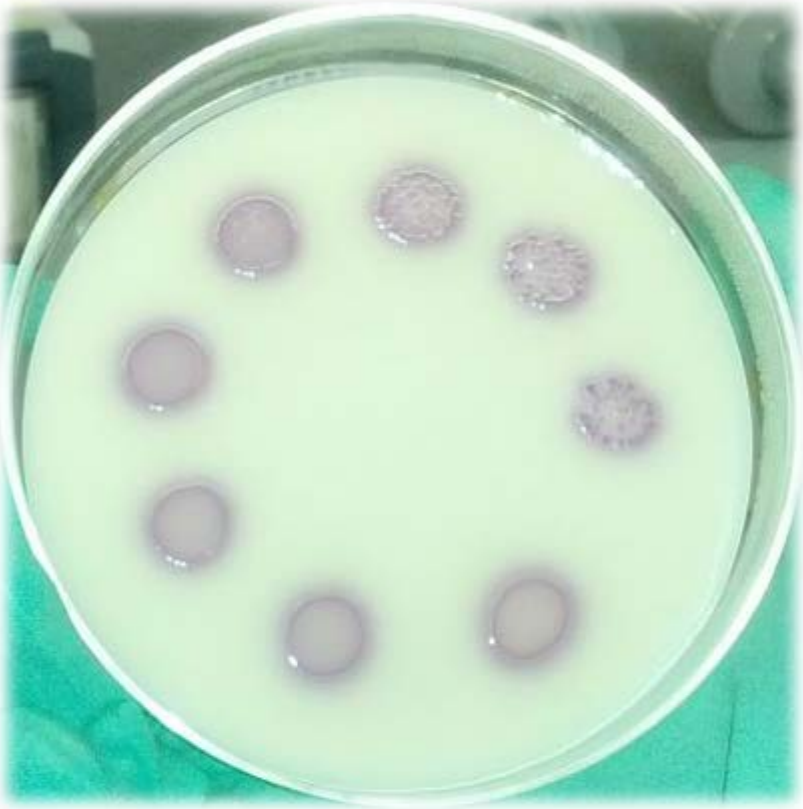


Fig. 9

È stata dispensata una goccia di sospensione batCterica senza essere strisciata, anche in questo caso il nostro obiettivo era quello di isolare la goccia in cui non sarebbe cresciuto niente.

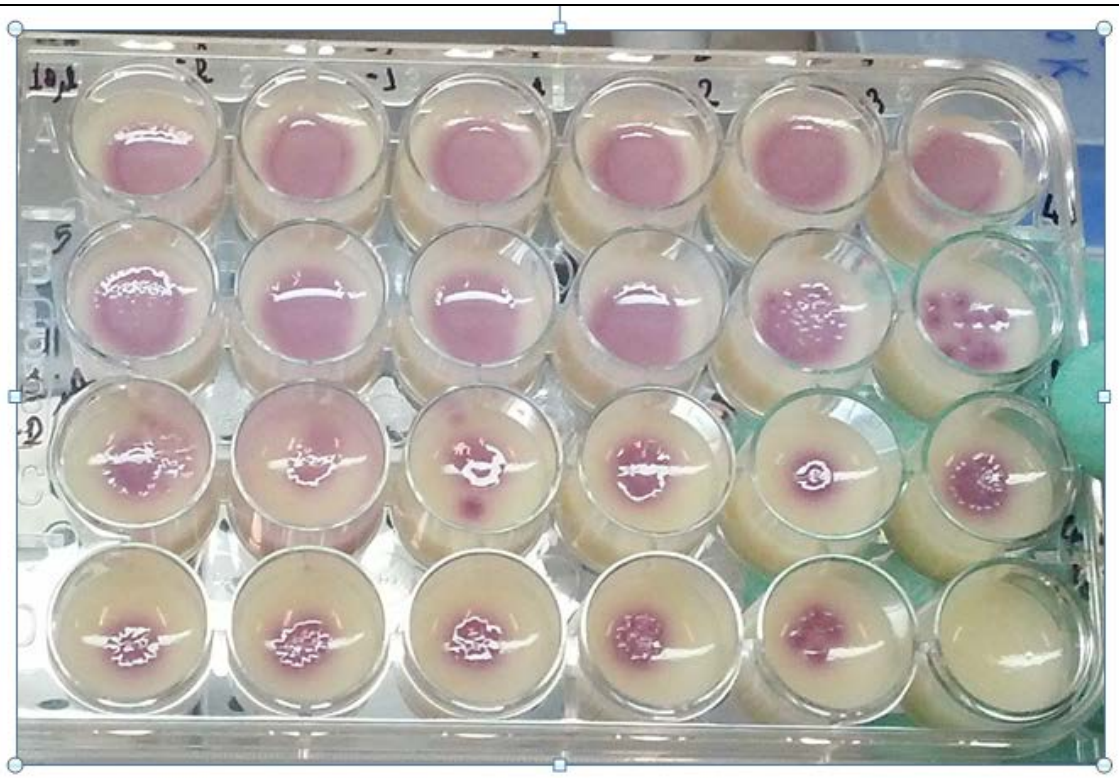
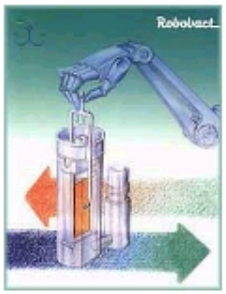


Fig. 10 Questi sono pozzetti per cellule. Il volume di terreno introdotto in questi pozzetti è pari a 5ml. Nel penultimo e ultimo pozzetto è possibile effettuare la conta.

Da tutti questi esperimenti preliminari è stato possibile apprezzare come l'uso di superfici solide troppo piccole va a discapito della qualità della crescita batterica, che gocce troppo piccole non sono contabili, mentre una goccia di 10µl rappresenta un giusto compromesso visivo e di spazi occupabili.

È stato quindi predisposto un lavoro di prototipizzazione di un nuovo device .

È stato quindi predisposto un lavoro di prototipizzazione di un nuovo device .



Il primo progetto comprendeva un device con dei setti laterali in maniera tale da dividere fisicamente i terreni. Questa idea non è stata portata avanti in quanto l'ansa durante la semina poteva toccare il setto e rovinare il terreno.

Nel secondo progetto si è pensato di cambiare la modalità di semina. Invece che per strisciamento simulando il lavoro dell'operatore, si è pensato di depositare delle gocce calibrate con l'uso di pompe estremamente precise e punte disposable. Anche questa

seconda idea è stata trascurata per via dei costi di tale ingegnerizzazione.

ATTIVITA' 6: Report e manualistica

Vedi Manuali Plus Finder

Strumenti/attrezzature

Indicare quali sono stati gli strumenti e le attrezzature utilizzati per la realizzazione delle attività.

Strumenti e attrezzature sono già disponibili presso il capofila e comprendono:

1. Strumentazione per lo sviluppo di prototipi meccanici e relativo software;
2. Strumenti del laboratorio di microbiologia (es. cappa biohazard, autoclave, vetreria, congelatori, ecc.)

Risorse umane

Indicare la percentuale di utilizzo delle risorse umane rispetto a quanto previsto.

PARTNER 1

Ricercatore: 100%

Personale Tecnico Qualificato: 100%

Co.Co.Pro: (* come da variante approvata del 23/05/2012) 100%

Subcontratti

Non previsti

Risultati raggiunti

Descrivere i risultati raggiunti e i punti cardine (*milestones*) di sviluppo nell'attuazione delle attività. Descrivere in maniera puntuale le eventuali difformità fra i risultati attesi e i risultati conseguiti scientificamente e tecnicamente e proporre le conseguenti azioni correttive.

Al momento sono disponibili le basi teoriche degli algoritmi di identificazione automatica

delle colonie che si sviluppano su terreni cromogeni; è inoltre disponibile un software utilizzabile per prove su piastre seminate manualmente. I risultati ottenuti sono congruenti.
Costi sostenuti
Indicare i costi sostenuti da ciascun partner per lo svolgimento dell'obiettivo operativo. PARTNER 1 € 471.184,80

(*) In caso di variante progettuale autorizzata, si deve fare riferimento al nuovo piano finanziario e al nuovo cronoprogramma approvato.

Coordinamento, gestione e rendicontazione

Si prega di utilizzare questa sezione per riassumere le attività relative alla gestione, amministrazione e rendicontazione del progetto e al coordinamento del partenariato (*).

Attività realizzate

Descrivere le attività di coordinamento, gestione e rendicontazione realizzate riguardo principalmente a:

- **Costituzione e gestione del partenariato e stipula dell'ATS/ATI**;

ATS costituita tra i tre partners il 31/03/2011 con mandato speciale con rappresentanza ed obbligo di rendicontazione conferito al partner 1 soggetto capofila.

- **Elaborazione ed approvazione di work-plan e relativa tempistica**;

Riunione organizzativa per approvazione work-plan effettuata il 05/04/2011.

I partners hanno approvato il Work-plan contenuto nella domanda di approvazione del progetto e sul quale hanno già iniziato prove esplorative.

- **Definizione dei responsabili delle attività delle diverse attività**:

I responsabili delle attività coincidono con i referenti scientifici di ciascun partner indicati nell'allegato B1 all'atto della presentazione della domanda, ogni partner è responsabile per le attività di ricerca svolte al suo interno.

- **Coordinamento e monitoraggio delle diverse fasi di attività**;

Ogni partner svolge l'attività di coordinamento e di monitoraggio delle fasi di ricerca all'interno del proprio gruppo. Periodicamente vengono indette delle riunioni per la verifica dello stato di avanzamento e per apportare eventuali varianti alle fasi progettuali. Il Capofila coordina le attività legate alla rendicontazione del progetto di tutto il gruppo ATS.

- **Attività svolte dal comitato tecnico-scientifico di progetto, se previsto**;

Non prevista la costituzione di un comitato tecnico-scientifico.

- **Varianti progettuali, se ci sono state, con riferimento alla composizione del partenariato, alla rimodulazione dei costi, al crono programma, all'anagrafica aziendale, alla fornitura del servizio di ricerca**;

Alla data della fine del progetto sono state presentate in totale n. 7 varianti progettuali in data:

23/05/2012 (n. 2 varianti per i partner 1 e 2), che hanno riguardato per il partner 1 (Diesse Ricerche) una rimodulazione dei costi del personale all'interno della voce stessa tra le

varie figure previste e per il partner 2 (UNISI) il cambio del nome del Dipartimento.

24/09/2012: (n. 2 varianti per i partner 1 e 3), che hanno riguardato per il partner 1 (Diesse Ricerche) una rimodulazione dei costi dei terreni spostata nelle consulenze e per il partner 3 (UNIFI) l'annullamento della voce Spese Generali

04/04/2013: n. 1 varianti per i partner 1 , che hanno riguardato per il partner 1 (Diesse Ricerche) per il cambio societario

14/05/2013: richiesta proroga 12 mesi

14/05/2013: (n. 4 varianti per i partner 2 e 3); per il partner 2 (UNISI) cambio di nome dipartimento e rimodulazione dalla voce altri costi di esercizio a risorse umane e all'interno di questa; per il partner 3 (UNIFI) cambio di nome del dipartimento

18/11/2013: n. 1 varianti per i partner 3 (UNIFI) che chiede una rimodulazione delle spese generali che necessitano di essere rendicontate e nelle risorse umane aumenta la voce di spesa dei professori

03/07/2014: n. 1 varianti per i partner 3 (UNIFI) che rimodula da altri costi di esercizio a risorse umane

- **Lista delle riunioni di progetto, le date e i luoghi dove sono avvenuti gli incontri**;

Riunioni per coordinamento e monitoraggio delle attività di ricerca:

- 05/04/11 riunione sulla visione globale del progetto e analisi test preliminari presso il capofila (Siena c/o TLS);
- 15/06/11 riunione sullo stato dell'arte del progetto presso il capofila (Siena c/o TLS);
- 28/11/11 riunione sullo stato dell'arte del progetto presso il capofila (Siena c/o TLS);
- 16/04/12 riunione sullo stato dell'arte del progetto e analisi test preliminari presso il capofila (Siena c/o TLS);
- 09/05/12 riunione su rendicontazione amministrativa presso partner 2 (Siena UniSI).
- 11/12/12 riunione sullo stato dell'arte del progetto presso il capofila (Siena c/o TLS);
- 09/04/13 riunione sullo stato dell'arte del progetto presso il capofila (Siena c/o TLS);
- 17/10/13 riunione sullo stato dell'arte del progetto presso il capofila (Siena c/o TLS);
- 14/05/14 riunione sullo stato dell'arte del progetto e relazione sulle coclusioni presso il capofila (Siena c/o TLS);

- **Eventuali deviazioni rispetto ai risultati attesi e ai punti fondamentali**

pianificati;

L'unica deviazione importante rispetto a quanto pianificato riguarda gli obiettivi OO3, OO4, OO5 inerenti ciascuno la realizzazione di uno strumento. Già a partire dal 3° mese è stato deciso di anticipare l'inizio di tutte le fasi di OO3 e OO4 e ritardare quelle di OO5, in modo da arrivare ad aver almeno due strumenti funzionanti (Preparatore ed Analizzatore) piuttosto che tre incompleti.

- **Sviluppo del sito web del progetto, se disponibile**;

E' stato attivato un sito Web del progetto URIMARK all'indirizzo www.urimark.org.

Il sito in fase di aggiornamento e ampliamento coerente alla conclusione.

- **Raccolta dei giustificativi di spesa e di tutta la documentazione necessaria per la rendicontazione**;

Il capofila ha ultimato la raccolta dei giustificativi di spesa e di tutta la documentazione necessaria per la propria rendicontazione e degli altri soggetti partner ai fini dell'inserimento nel sito di ARTEA in vista del SAL; gli originali sono catalogati e archiviati secondo le modalità necessarie alla conservazione dei medesimi ai fini di audit esterne fino al 31/12/2020;

- **Redazione dei documenti richiesti e reportistica di natura tecnico-finanziaria**:

La redazione dei documenti richiesti e la reportistica di natura tecnico-finanziaria è stata verificata dal capofila ed inserita nel sito di ARTEA per il SALDO.

Risorse umane

Indicare la percentuale di utilizzo delle risorse umane rispetto a quanto previsto.

PARTNER 1

100,00%

PARTNER 2

100,00%

PARTNER 3

100,00%

Risultati raggiunti

Descrivere i risultati raggiunti e i punti cardine (*milestones*) nell'attuazione delle attività di project management. Descrivere in maniera puntuale qui di seguito le eventuali difformità

fra i risultati attesi e i risultati conseguiti scientificamente e tecnicamente e proporre le conseguenti azioni correttive.

- Costituzione ATS tra i partners il 31/03/2011;
- riunione iniziale (05/04/2001) per valutare le operatività del progetto e delle prove esplorative che ciascun partner ha già effettuato antecedentemente alla costituzione dell'ATS;
- riunioni periodiche (15/0/11, 28/11/11, 16/04/12 e 9/05/12) tutte eccetto l'ultima, presso partner 1 capofila;
- presentata variante in data: 23/05/2012 (n. 2 varianti per i partner 1 e 2), che hanno riguardato per il partner 1 (Diesse Ricerche) una rimodulazione dei costi del personale all'interno della voce stessa tra le varie figure previste e per il partner 2 (UNISI) il cambio del nome del Dipartimento;
- Avvio della raccolta dei giustificativi di spesa e di tutta la documentazione necessaria per la rendicontazione da parte del capofila.

Riguardo alle attività relative alla gestione, amministrazione e rendicontazione del progetto e al coordinamento del partenariato sono emerse delle difformità che che hanno richiesto delle varianti per i partner 1 , 2 e 3 che riguarderanno rimodulazioni del budget superiori al 20%.

Costi sostenuti

Inserire i costi sostenuti da ciascun partner per lo svolgimento dell'obiettivo operativo di coordinamento, gestione e rendicontazione.

PARTNER 1

€ 34.702,07

PARTNER 2

€ 68.597,04

(*) In caso di variante progettuale autorizzata, si deve fare riferimento al nuovo piano finanziario e al nuovo cronoprogramma approvato.

Disseminazione dei risultati del progetto

Si prega di fornire una sintesi riguardo alle attività di diffusione dei risultati del progetto (*).

Attività realizzate
Illustrare le attività che sono state realizzate relative alla disseminazione dei risultati del progetto Alcuni risultati prodotti dalle fasi di studio e realizzazione del progetto sono stati resi pubblici in diverse forme: N° 3 tesi di laurea magistrale in Ingegneria Informatica contenenti aspetti software, meccanici ed elettronici dei due strumenti relativi a OO3 e OO4. N° 3 seminari presso la Facoltà di Ingegneria al corso di Bioinformatica, sulle tecniche utilizzate nel progetto per l'analisi delle urine. Domande di deposito BREVETTI nella maggior parte dei paesi dl mondo Preparazione da parte del Marketing di Diesse Diagnostica Senese Spa, che distribuirà in futuro il sistema, di un depliant informativo sugli strumenti di OO3 e OO4 che verrà poi utilizzato nelle presentazione ufficiale al mercato italiano in occasione del **XLI congresso AMCLI a Rimini dal Novembre 2012. 2013 2014** **MEDICA (Germania) NOVEMBRE 2013 2014** **TOSCANA TECNOLOGICA LUGLIO 2014 FIRENZE**
Strumenti/attrezzature
Indicare quali sono gli strumenti e le attrezzature utilizzati per la disseminazione dei risultati del progetto

Per la disseminazione dei risultati sono stati utilizzati principalmente tre strumenti informativi.

Il primo è stato quello di collaborazione scientifica con la facoltà di Ingegneria dell'Università degli Studi di Siena.

Il secondo dal gruppo marketing di Diesse Diagnostica Senese Spa, la società che distribuirà sul mercato i prodotti risultati da questo progetto di ricerca.

In particolare Diesse Diagnostica Senese Spa ha intrapreso una campagna informativa sul mercato attraverso la preparazione di brochure e incontri preliminari con i potenziali clienti, che porteranno alla commercializzazione ufficiale a partire dal il prossimo Gennaio (2015).

Il terzo è un sito Web in fase di ampliamento (www.urimark.org).

Risorse umane

Specificare le professionalità e i rispettivi tempi (mesi uomo) che sono stati necessari alla realizzazione delle attività. Indicare la percentuale di utilizzo delle risorse umane rispetto a quanto previsto.

Per la disseminazione il capofila partner 1 del progetto ha impiegato un esperto di sviluppo sistemi diagnostici che ha seguito i rapporti con la Facoltà di Ingegneria dell'Università degli Studi di Siena. L'attività è consistita nel seguire la compilazione delle tesi e nel tenere due seminari durante il corso di bioinformatica.

E' stato inoltre supportato il marketing di Diagnostica Senese Spa, quale futuro distributore dei prodotti inerenti tale progetto, per la stesura di materiale informativo e viaggi per contatti preliminari con potenziali clienti. L'attività che si è svolta in circa 5 mesi ha richiesto 1 mese uomo pari al 0,5% delle risorse umane (Ricercatore).

Risultati

Illustrare quali risultati di disseminazione sono stati raggiunti

Al momento i risultati ottenuti dalla disseminazione sono individuati in:

1_ Tre tesi di Laurea in Ingegneria Informatica presso L'Università degli Studi di Siena e l'avvio con questa di rapporti scientifico tecnologici di alto livello.

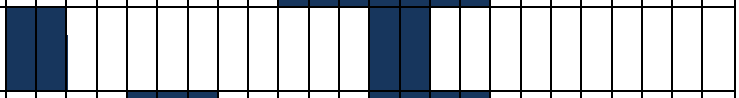
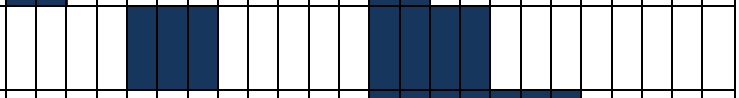
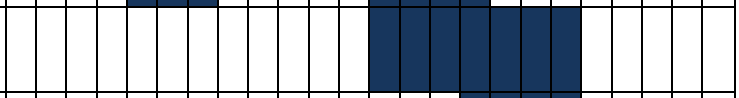
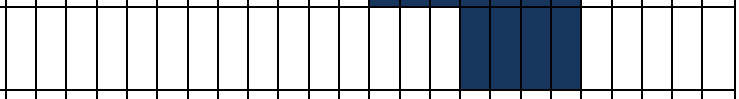
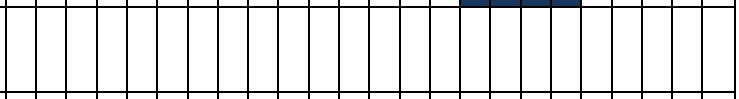
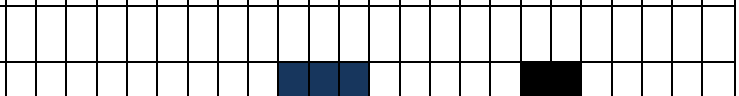
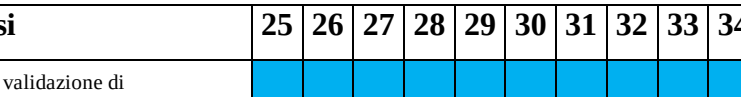
2_ Creazione di un grande interesse e attesa sul mercato italiano per l'uscita delle piattaforme analitiche corredate di reagenti innovativi.
Costi sostenuti
Inserire i costi sostenuti da ciascun partner per lo svolgimento dell'obiettivo operativo (disseminazione dei risultati del progetto). Per questo obiettivo operativo il costo sostenuto è stato 1 mese uomo (categoria Ricercatori) del totale a carico del capofila partner 1.

(*) In caso di variante progettuale autorizzata, si deve fare riferimento al nuovo piano finanziario e al nuovo cronoprogramma approvato.

5. AGGIORNAMENTO DEL CRONOPROGRAMMA

Si prega di riprogrammare le attività all'interno del cronoprogramma in funzione dei risultati raggiunti nel periodo di riferimento, per disporre di una visione aggiornata di quest'ultimo. Quello sotto riportato è un format che può essere adeguato alle singole esigenze.

		Mesi																						
	Attività/ Milestones	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**
OO1 *Ricerca e sviluppo di reagenti Immunologici*	**1.**Identificazione	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■					
	2.Mappatura	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■												
	3.Utilizzo Peptidi													■	■	■	■	■	■	■					
	4.Immobilizzazione peptidi										■	■	■	■	■	■	■	■	■	■					
OO 2 Realizzazione dei kit e loro applicazioni automatiche	**1.**Produzione anticorpi mono e policlonali	■	■																						
	2.Realizzazione kit diagnostici piastra Elisa			■	■	■	■	■	■																
	3.Sperimentazione Interna													■	■	■									
	4.Automazione su Chorus														■	■	■								
	5.Sperimentazione interna con Chorus															■	■	■							
	6. Sperimentazione esterna e file tecnico																		■	■					
OO 3 Realizzazione preparatore	**1.**Studio contenitore	■	■																						
	2.Adattabilità campioni			■	■																				
	3.Meccanica strumento					■	■	■	■	■	■														
	4.Studio contenitori e terreni							■	■	■	■														
	5.Associazione univoca					■	■	■																	
	6.Sterilità, manualistica									■	■	■	■	■	■	■	■								
OO 4 Realizzazione strumento screening	**1.**Studio sensoristica	■	■	■																					
	2.Tempistica ciclo				■	■																			
	3.Incubatore						■	■	■																
	4.Software controllo eventi									■	■	■													
	5.Studio terreni e antibiotici												■	■											

	6.Sperimentazione e manualistica	
OO 5 Realizzazione strumento per isolamento e identificazione	**1.**Riconoscimento colonie semina automatica	
	2.Software di elaborazione	
	3.Studio terreni agarizzati	
	4.Verifica con semina manuale	
	5.Sperimenta int. e est.	
	6.Manualistica	
Gestione rendicontazione	Gestione	
	Rendicontazione	
Disseminazione		

	Attività/mesi	**25**	**26**	**27**	**28**	**29**	**30**	**31**	**32**	**33**	**34**	**35**	**36**
Obiettivo Operativo 1	Identificazione e validazione di biomarcatori urinari proteici e peptidici mediante tecnologia proteomica. Caratterizzazione biochimica di anticorpi anti-Legionella pneumophila mono e policlonali (UniSi)												
	Caratterizzazione biochimica di anticorpi anti-Legionell pneumophila mono e policlonali (UniSi).												
	Mappatura degli antigeni peptidici dei biomarcatori proteici identificati (UNIFI)												
	Utilizzo di peptidi sintetici per screening di anticorpi in campioni di urina e produzione di anticorpi monoclonali ad alta affinità per lo sviluppo dei kit diagnostici ad elevata specificità (UNIFI e DIESSE)												
	Immobilizzazione di antigeni e anticorpi su chip biosensore ottico per lo sviluppo di nuovi sistemi diagnostici ad elevata specificità e sensibilità (Unisi, Unifi e Diesse)												
Obiettivo Operativo 2	Produzione, valutazione e selezione degli anticorpi monoclonali e/o policlonali idonei all'impiego in test Elisa												
	Realizzazione dei kit diagnostici su piastra Elisa												
	Sperimentazione interna												
	Automazione dei test su strumento Chorus												
	Sperimentazione interna dei kit in automazione su strumento Chorus												

	Sperimentazione esterna e allestimento del file tecnico secondo quanto richiesto dalla normativa europea Iso												
Obiettivo Operativo 3	Studio tipo contenitore per esame												
	Adattabilità alle varie tipologie di contenitori in ingresso												
	Meccanica dello strumento												
	Studio contenitori e terreni da infialare e test biochimici di base												
	Associazione univoca												
	Validazione sterilità ed eventuale carry over più report e manualistica												
Obiettivo Operativo 4	Studio sensoristica per la deiezione del fenomeno di crescita												
	Studio tempistica del ciclo												
	Realizzazione di un incubatore												
	Software di controllo per il monitoraggio degli eventi in funzione del tipo di sensore da utilizzare												
	Sviluppo dei terreni adatti alla nuova procedura e dei terreni con varie associazioni di antibiotici												
	Sperimentazione interna ed esterna (sia su ceppi di collezione che “selvaggi”) + report e manualistica												
Obiettivo Operativo 5	Studio di sistema di riconoscimento colonie su semina effettuata da strumento automatico												
	Sviluppo software di elaborazione												
	Studio terreni agarizzati, ottimizzazione												
	Verifica contro semina manuale come riferimento												
	Sperimentazione interna ed esterna (sia su ceppi di collezione che “selvaggi”)												
	Report e manualistica												
Gestione e Rendicontazione	gestione												
	rendicontazione												
Disseminazione													

6. RILEVAZIONE PROIEZIONI E RISULTATI INDICATORI DOCUMENTO DI ATTUAZIONE REGIONALE

Indicatori di realizzazione

Obiettivo operativo	Indicatore di realizzazione	Unità di Misura	Valore al medio periodo
Consolidare la capacità regionale in R&S finalizzato al trasferimento tecnologico e sostegno ai processi di innovazione	Numero di imprese condotte da donne presenti nel partenariato di progetto[1].	N	0

Indicatori di risultato

Obiettivo specifico	Indicatore di risultato	Unità di Misura	Valore al medio periodo
Consolidare la competitività del sistema produttivo regionale promuovendo la ricerca, il trasferimento tecnologico e rafforzando i processi di innovazione e l'imprenditorialità	Domande di brevetto inerenti il mercato nazionale[2]	N	0
	- di cui presentate all'EPO	N	0
	Indicatore di risultato	**Unità di Misura**	**Valore atteso a fine progetto**
	Previsione di domande di brevetto inerenti il mercato nazionale presentate ad un anno dalla chiusura del progetto[3]	N	**1**
	- di cui presentate all'EPO	N	**1**

1

Andrà inserito il valore 1 se l'impresa è condotta da donne, mentre andrà inserito il valore zero nel caso contrario. Le imprese saranno considerate a conduzione femminile quando: - nel caso di ditta individuale il titolare è una donna; - nel caso di società di persone e di cooperative almeno il 60% dei soci è rappresentato da donne; - nel caso di società di capitali almeno i 2/3 delle quote sono detenute da donne e l'organo di amministrazione è composto da donne per almeno i 2/3. Nel caso di progetti realizzati da imprese in forma aggregata, l'indicatore assumerà valore 1 quando nel raggruppamento vi sia almeno una impresa che ricade nella casistica sopra richiamata..

2 Andrà inserito il numero di domande di brevetto presentate all'Ufficio Italiano Brevetti (UIB).

3 Andrà inserito il numero di domande di brevetto presentate all'Ufficio Italiano Brevetti (UIB).

Indicatori di impatto (valore al medio periodo).

Obiettivo specifico	Indicatore di impatto	Unità di Misura	Valore al medio periodo	
Consolidare la competitività del sistema produttivo regionale promuovendo la ricerca, il trasferimento tecnologico e rafforzando i processi di innovazione e l'imprenditorialità	Numero di posti di lavoro creati nella ricerca[4]	ULA	6,58	
	- di cui donne	ULA	5,08	
	Numero di posti di lavoro creati nella ricerca in fase di cantiere[5]	ULA	0,5	
	- di cui donne	ULA	0	
	Numero di posti di lavoro creati nella ricerca in fase di gestione[6]	ULA	2010	0
			2011	0
			2012	3
			2013	0
	- di cui donne	ULA	2	
	Numero di posti di lavoro creati da aiuti agli investimenti delle imprese beneficiarie[7]	ULA	0	
	- di cui donne	ULA	0	

[4] Posti di lavoro creati complessivamente nella ricerca, dati dalla sommatoria dei posti di lavoro creati in fase di cantiere e in fase di gestione.

[5] Deve essere inserito il numero di addetti alla R&S, occupati in via temporanea, per la realizzazione del progetto di ricerca. L'indicatore va espresso in ULA (che costituisce la quantità di lavoro prestata nell'anno da un occupato a tempo pieno. Ad esempio, due occupati che lavorano un anno ciascuno metà giornata rappresenteranno una ULA).

[6] Vanno inseriti i posti di lavoro non temporanei creati dal progetto dedicati allo svolgimento di attività di R&S. L'indicatore va espresso in ULA.

[7] Vanno inseriti i nuovi posti di lavoro permanenti che si creano nell'impresa al medio periodo dedicati allo svolgimento di attività non riclassificabili come ricerca e sviluppo in senso stretto (ad esempio area amministrativa, produttiva, commerciale, segreteria). L'indicatore va espresso in ULA.

Indicatori di impatto (valore atteso a fine progetto).

Obiettivo specifico	Indicatore di impatto	Unità di Misura	Valore atteso a fine progetto	
Consolidare la competitività del sistema produttivo regionale promuovendo la ricerca, il trasferimento tecnologico e rafforzando i processi di innovazione e l'imprenditorialità	Numero di posti di lavoro creati nella ricerca[8]	ULA	8	
	- di cui donne	ULA	6	
	Numero di posti di lavoro creati nella ricerca in fase di cantiere[9]	ULA	1	
	- di cui donne	ULA	0	
	Numero di posti di lavoro creati nella ricerca in fase di gestione[10]	ULA	2010	0
			2011	0
			2012	3
			2013	0
	- di cui donne	ULA	2	
	Numero di posti di lavoro creati da aiuti agli investimenti delle imprese beneficiarie[11]	ULA	0	
	- di cui donne	ULA	0	

[8] Posti di lavoro creati complessivamente nella ricerca, dati dalla sommatoria dei posti di lavoro creati in fase di cantiere e in fase di gestione.

[9] Deve essere inserito il numero di addetti alla R&S, occupati in via temporanea, per la realizzazione del progetto di ricerca. L'indicatore va espresso in ULA (che costituisce la quantità di lavoro prestata nell'anno da un occupato a tempo pieno. Ad esempio, due occupati che lavorano un anno ciascuno metà giornata rappresenteranno una ULA).

[10] Vanno inseriti i posti di lavoro non temporanei creati dal progetto dedicati allo svolgimento di attività di R&S. L'indicatore va espresso in ULA.

[11] Vanno inseriti i nuovi posti di lavoro permanenti che si creano nell'impresa alla conclusione del progetto dedicati allo svolgimento di attività non riclassificabili come ricerca e sviluppo in senso stretto (ad esempio area amministrativa, produttiva, commerciale, segreteria). L'indicatore va espresso in ULA.

Letto, approvato e sottoscritto dal Rappresentante legale dell'Impresa Capofila.

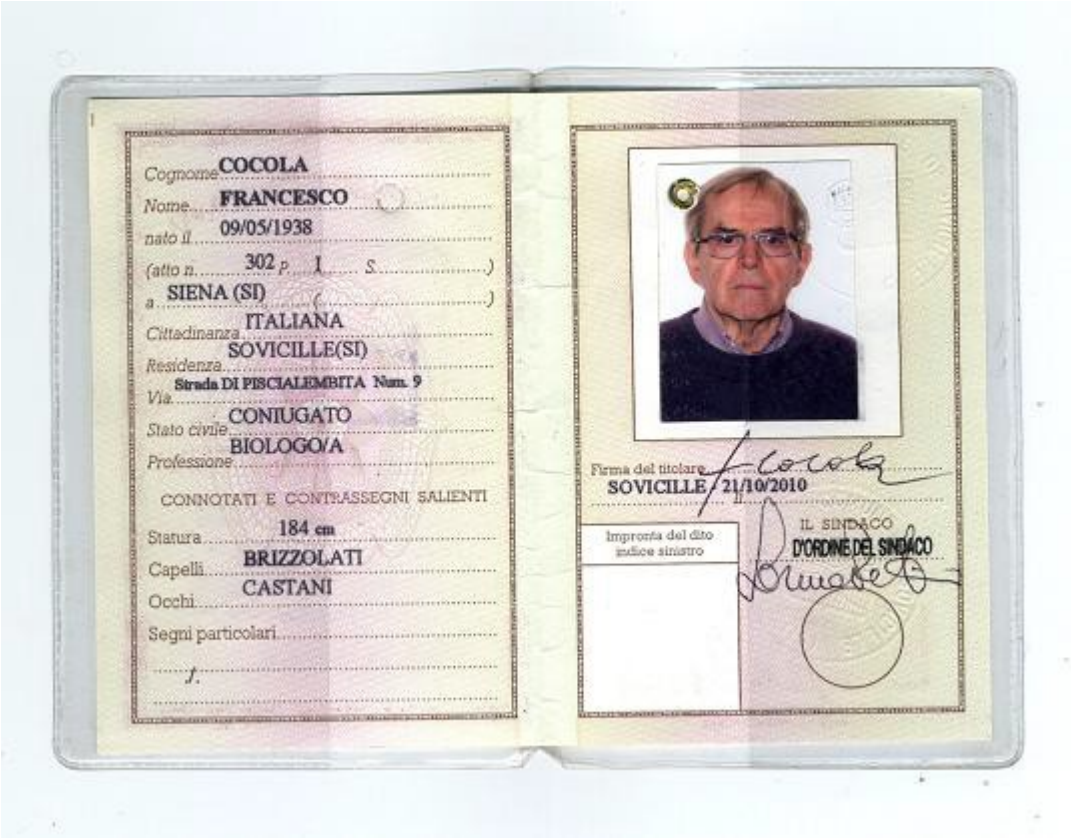
Data

20/10/2014

Firma del Rappresentante legale

Dott.

Allega documento di identità in corso di validità del Rappresentante legale dell'impresa capofila


Cognome COCOLA
Nome FRANCESCO
nato il 09/05/1938
(atto n. 302 p. 1 S.)
a SIENA (SI) ( )
Cittadinanza ITALIANA
Residenza SOVICILLE(SI)
Via Strada DI PISCIALEMBITA Num. 9
Stato civile CONIUGATO
Professione BIOLOGO/A
CONNOTATI E CONTRASSEGNI SALIENTI
Statura 184 cm
Capelli BRIZZOLATI
Occhi CASTANI
Segni particolari
Firma del titolare
SOVICILLE 21/10/2010
Impronta del dito indice sinistro
IL SINDACO
D'ORDINE DEL SINDACO

Scade il 21/10/2020
Cart. Iden.
Dir. Segreteria
€ 5,16
€ 0,26
AR 4415434
REPVBBLICA ITALIANA
COMVNE DI
SOVICILLE
CARTA D'IDENTITA'
N° AR 4415434
DI
COCOLA
FRANCESCO